



TITLE:

イチゴ果実の発育に関する研究(Dissertation_全文)

AUTHOR(S):

加納, 恭卓

CITATION:

加納, 恭卓. イチゴ果実の発育に関する研究. 京都大学, 1982, 農学博士

ISSUE DATE:

1982-01-23

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.r4637>

RIGHT:

新 制
農
3 46

京大附図

イチゴ果実の發育に関する研究

加 納 恭 卓

イチゴ果実の發育に関する研究

加 納 恭 卓

目 次

言	1
<i>in vitro</i> におけるイチゴ果実の発育	4
緒 言	4
果実組織の培養における種子の役割	4
実験材料および方法	4
実験結果	5
<i>in vitro</i> における果実発育におよぼす心皮および植物ホルモンの影響	9
実験材料および方法	9
実験結果	9
考 察	12
摘 要	16
イチゴ果実の発育におけるサイトカイニンの役割	17
緒 言	17
イチゴ果実の内生サイトカイニン様物質	17
実験材料および方法	17
実験結果	18
果実中のサイトカイニンの生成部位	20
実験材料および方法	20
実験結果	20
果実発育に伴う果実中のサイトカイニンレベルの消長	21
実験材料および方法	21
実験結果	21
果実の内生サイトカイニンレベルにおよぼすMHの影響	22
実験材料および方法	22
実験結果	22
果実発育および果実中のサイトカイニンレベルにおよぼす温度の影響	24
実験材料および方法	24
実験結果	24
考 察	25
摘 要	28

イチゴ果実の発育における ABA の役割	30
節 緒 言	30
節 果実発育に伴う内生抑制物質レベルの消長	30
実験材料および方法	30
実験結果	31
節 果実発育におよぼす ABA の影響	33
実験材料および方法	33
実験結果	33
節 果実発育におよぼす ABA と BA の相互作用	35
実験材料および方法	35
実験結果	35
節 果実発育および果実中の ABA レベルにおよぼすサイトカイニンの影響	36
実験材料および方法	36
実験結果	36
節 果実発育および果実中の ABA レベルにおよぼす心皮除去の影響	37
実験材料および方法	37
実験結果	37
節 果実発育および果実中の ABA レベルにおよぼす MH の影響	37
実験材料および方法	37
実験結果	38
節 考 察	38
節 摘 要	40
イチゴ果実の発育におけるエチレンの役割	41
節 緒 言	41
節 果実発育に伴う果実からのエチレン発生量の消長	41
実験材料および方法	41
実験結果	42
節 果実発育および果実からのエチレン発生量におよぼすサイトカイニンの影響	42
実験材料および方法	42
実験結果	43
節 果実発育および果実からのエチレン発生量におよぼす ABA の影響	44
実験材料および方法	44
実験結果	44
節 果実発育におよぼすエチレンの影響	44

I 実験材料および方法	44
II 実験結果	45
第6節 考 察	45
第7節 摘 要	47
第5章 総 括	48
引用文献	51
Summary	55

第3章 イチゴ果実の発育におけるABAの役割	30
第1節 緒言	30
第2節 果実発育に伴う内生抑制物質レベルの消長	30
Ⅰ 実験材料および方法	30
Ⅱ 実験結果	31
第3節 果実発育におよぼすABAの影響	33
Ⅰ 実験材料および方法	33
Ⅱ 実験結果	33
第4節 果実発育におよぼすABAとBAの相互作用	35
Ⅰ 実験材料および方法	35
Ⅱ 実験結果	35
第5節 果実発育および果実中のABAレベルにおよぼすサイトカイニンの影響	36
Ⅰ 実験材料および方法	36
Ⅱ 実験結果	36
第6節 果実発育および果実中のABAレベルにおよぼす心皮除去の影響	37
Ⅰ 実験材料および方法	37
Ⅱ 実験結果	37
第7節 果実発育および果実中のABAレベルにおよぼすMHの影響	37
Ⅰ 実験材料および方法	37
Ⅱ 実験結果	38
第8節 考察	38
第9節 摘要	40
第4章 イチゴ果実の発育におけるエチレンの役割	41
第1節 緒言	41
第2節 果実発育に伴う果実からのエチレン発生量の消長	41
Ⅰ 実験材料および方法	41
Ⅱ 実験結果	42
第3節 果実発育および果実からのエチレン発生量におよぼすサイトカイニンの影響	42
Ⅰ 実験材料および方法	42
Ⅱ 実験結果	43
第4節 果実発育および果実からのエチレン発生量におよぼすABAの影響	44
Ⅰ 実験材料および方法	44
Ⅱ 実験結果	44
第5節 果実発育におよぼすエチレンの影響	44

Ⅰ 実験材料および方法	44
Ⅱ 実験結果	45
第6節 考 察	45
第7節 摘 要	47
第5章 総 括	48
引用文献	51
Summary	55

緒 言

イチゴ栽培では多くの作型が開発されたため、昭和 45 年以来生産が急激に向上した。その結果、高級果物としてのイメージの強かったイチゴは一般大衆のものとなった。このイチゴの大衆化に伴い表面化したのは、生産規模の拡大に伴う収穫・出荷に費いやされる労働力の増大と収穫後の鮮度保持の問題であった。収穫時のイチゴ果実の果色は鮮明な橙赤色で、果肉は軟かく果皮の強じん性もかなり低下しているため、果皮に傷をつけないように丁寧に収穫しなければならない。また、収穫後の果実では果色は急激に暗赤色になり果肉は劣化し鮮度は低下する。

収穫時の果実の取扱いにくさ、そして収穫後の鮮度保持のいずれの問題も、収穫時のイチゴ果実がどのような発育生理状態、すなわち着色程度、果皮の強さおよび肉質になっているかに深く関連しているものと考えられる。しかし、収穫時の果実の発育生理状態は、その果実が開花から収穫までどのような発育過程をとってきたか、特に発育後期における発育状態に大きく左右されるものと思われる。

さて、果実の発育は温度、日長、栄養肥料および土壤水分などの外的条件により大きく影響されるのは勿論であるが、1936 年、Gustafson が受精の代りにトマト果実にオーキシン処理を行えば果実は単為結果し正常に発育することを発見して以来、植物ホルモンが果実発育の重要な内的要因であることが認識されることとなった。そこで、植物ホルモンと果実発育との関連性を調べた報告が数多くだされ続けてきたが、これらの報告は、1) 種子が植物ホルモンの生成部位である、2) 果実中の植物ホルモンのレベルは種子の発育と密接に関連している、および 3) 外部より植物ホルモンを果実に処理すれば、受精なしに果実は着果し正常に発育する、の 3 点に要約できる。これらのことより、種子および植物ホルモンが果実発育に決定的な影響力をもっていることが一般的な知見となった。イチゴ果実の発育における種子および植物ホルモンの役割については、Nitsch (1950) が受精した種子を除去してもその代りにオーキシンを処理すれば果実は正常に肥大することを実証したのが最初であった。その後、彼(1955)は受精した種子ではオーキシンレベルが極めて高く、オーキシンがイチゴ果実の発育に重要な役割を果たしていることを強調した。また、イチゴ果実はオーキシンにより単為結果し、果実は正常に発育することが指摘されてきた (Gardner・Marth 1937, Hunter 1941, Lord・White 1962, Thompson 1964, 1967, 1969)。このように、オーキシンがイチゴ果実の発育を制御していることがうかがえる。しかし、この考え方とはまったく逆に、Thompson (1961) はイチゴ果実が受精しないと発育しないのは未受精種子に果実発育に抑制的に作用する物質が含まれているため、一方受精により果実が発育するのは受精によりこの抑制物質が消失するためであるとした。Creasy・Sommer (1964) および Bajaj・Collins (1968) はこの未受精種子に含まれている抑制物質は、アンチ・ジベレリン様物質であろうと報告している。さらに Creasy・Sommer (1964) は受精により種子中にジベレリンが生成され、このジベレリンがイチゴ果実の発育を促進することを示唆した。しかし、Thompson (1967, 1969) はジベレリンを単独で処理しても果実は発育しないが、オーキシンと混合し処理した場合にはジベレリンはイチゴ果実の発育に促進的に作用しうることを示した。このように、イチゴ果実の発育

の誘起およびその後の発育に対する種子およびオーキシンそしてジベレリンの役割については意見がいまだに定まっていない。

一方、他の植物ホルモンがイチゴ果実の発育におよぼす影響については次のような研究があるが、イチゴ果実の発育におけるそれらの植物ホルモンの役割が明確にされていない。アブサイシン酸(ABA)については、Rudnickiら(1968)が未熟な果実より赤く成熟した果実に含量が高いことを明らかにし、ABAが成熟の促進要因としての可能性のあることを示唆しているのみにとどまっている。エチレンについては、岩田(1970)、田辺ら(1972)が果実の成熟前に内生エチレンの発生が多くなることを示した。さらに、岩田(1970)は外生的にエチレンを処理しても成熟は促進されないことを明らかにしている。

なお、サイトカイニンについてはイチゴ果実の発育におよぼす影響を研究した報告はまったく見当らない。

このように、イチゴ果実の発育における種子および上述した数種の植物ホルモンの役割についてはまだ明確にされていない部分が多い。さらに上述してきた報告では着果という果実発育のごく初期における植物ホルモンの働きについてのみ主眼をおき考察しており、また、果実発育を1つの植物ホルモンの変化のみで説明しようと試みている。

そこで、本論文では種子およびこれらの植物ホルモンが果実発育の初期ではなく後期においてどのような役割を果たしているかを、種子の発育と平行して調べると同時に、果実の発育は決して1つの植物ホルモンによって制御されているのではなく、数種のもの、その中でも特にサイトカイニンとABAが相互に作用しあつた結果あらわれた現象であるという見解のもとに、果実からの植物ホルモンの抽出実験、ならびにそれらの植物ホルモンの果実発育に対する効果をより確かなものにするため、*in vitro*での果実培養の実験を行い、その結果から果実発育、特に成熟に関する各種植物ホルモンの役割を明確にした。

なお、以上に述べたイチゴの種子とは、果たく上に多数着生しているそう果のことで、これは雌ずいの基部の心皮が受精後発達したもので、真果に相当する。そこで、イチゴの受精した種子はそう果と記すべきであるが、一般的でないため、本論文ではこれを種子と表現した。また、イチゴ果実としたものは発生学的には偽果であり、主として食用に供される部分は花たくが受精後発達した果たくであるが、本論文ではこれを果実と表現した。また、図および表の説明文、そしてSummaryの英文では、心皮を *carpel*、種子を *achene*、果たくを *receptacle*、および心皮あるいは種子を除去しない *intact* の果実を *fruit* と記した。

謝 辞

本研究は京都大学教授 浅平端博士の御指導のもとに行われたもので、ここに謹んで衷心より深甚の謝意を表するものである。また、御懇意な御教示を賜わった京都大学名誉教授 塚本洋太郎博士に深謝の意を表わすものである。

イチゴ苗の調達にあたっては、前奈良県農業試験場長、現京都大学教授 藤本幸平博士、奈良県農業試験

場技師 木村雅行博士，同県農業試験場技師 三浦泰明氏に御協力を賜わった。また，サイトカイニンの抽出にあたっては，京都大学教授 小清水弘一博士に懇切な御指導を賜わった。なお，本研究の遂行にあたっては，京都大学農学部そ菜花卉園芸学研究室および同学部附属農場の各位に御便宜，御協力を賜わった。ここに謹しんで深謝の意を表するものである。

第1章 *in vitro*におけるイチゴ果実の発育

第1節 緒 言

Skoog・Miller(1957)によるタバコ髓組織の培養による研究以来, *in vitro* 培養によって植物組織の脱分化および再分化に対する, 植物ホルモンの役割を調べた研究は多いが, 培養組織の外生植物ホルモンに対する生長反応とその組織の生理状態あるいはその組織中の内生植物ホルモンのレベルとの関連性を調べた研究は極めて少ない。そこで, この関連性が解析されれば培養組織の生長の様相からその組織の内生植物ホルモンの相対的なレベルが推定されるとともに, その組織の生理的状态を推論することが可能と考えられる。

一方, 多くの果実で果実の発育が種子で生成される植物ホルモンによって制御されていることが報告されている。一般に種子は果実の内部に存在するため果実組織を損傷することなく種子を除去することは極めて困難であるが, Nitsch(1950)はイチゴ果実を用いれば果実組織にはあまり傷をつけることなく種子を除去できることを認め, 種子を除去してもその代りにオーキシンを処理すれば果実は正常に肥大することを実証した。彼(1955)はまた, イチゴの受精した種子で生成されているオーキシンはイチゴ果実の肥大に重要な役割を果していることを示した。これとは逆に, Thompson(1961)は受精により未受精の心皮に含まれている果実の肥大に抑制的に作用する物質が除去され, このことが果実の肥大のきっかけとなることを示唆した。一方, Nitsch(1951)は*in vitro*でトマトの子房培養に成功し, この技術が果実発育の生理的な解析に極めて有利であることを指摘した。これに引き続き Creasy・Sommer(1964)そして Bajaj・Collins(1968)はイチゴ果実を*in vitro*で培養し未受精心皮に含まれ, 果実肥大に抑制的に作用する物質はアンチ・ジベレリン様物質であろうとした。このようにイチゴの心皮で生成されている植物ホルモンの果実発育に対する役割について多くの見解が提出されてきているが, まだ多くの問題が残されている。

そこで, はじめにイチゴの果実組織を用い果実の齢および培養組織における種子の有無が培養組織から形成されてくるカルスの性状や生長量とどのような関連性をもっているかについて検討し, 果実の齢による果実組織の生理的变化を内生植物ホルモンの面から考察した。さらに, イチゴの開花1日前の果実から植物ホルモンの生成の場としての心皮を除去した, あるいは除去しない果実を種々の植物ホルモンを添加した培地で器官培養し, 心皮および植物ホルモンの果実発育における役割を詳細に検討しようとした。

第2節 果実組織の培養における種子の役割

1. 実験材料および方法

1970年京都大学農学部実験圃場で促成栽培中のイチゴ品種“宝交早生”から開花後2, 7, 12, 17日目

(以下 2, 7, 12, 17 日齢と記す)の果実を採取し、次亜塩素酸ナトリウム水溶液(有効塩素 2%)で 10 分間消毒後、殺菌水で洗浄した。これらの果実より、がく、花弁をピンセットで、種子を除去する必要のある場合には解剖用ピンで除去し、 $4 \times 4 \times 4$ mm の大きさの組織片を切り取り、試験管に 20 ml ずつ分注した培地に 1 切片ずつ置床した。基本培地には KNO_3 1900 mg/l, NH_4NO_3 1650 mg/l, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 440 mg/l, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 370 mg/l, KH_2PO_4 170 mg/l の Murashige・Skoog (1962) の主要塩類に $\text{MnSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 35 mg/l, H_3BO_3 10 mg/l, $\text{ZnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 10 mg/l, KI 1 mg/l, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 25 mg/l, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.035 mg/l, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.035 mg/l, ミオ・イノシトール 100 mg/l, ニコチン酸 5 mg/l, グリシン 2 mg/l, 塩酸ピリドキシン 0.5 mg/l, 塩酸サイアミン 0.5 mg/l, 葉酸 0.5 mg/l, ビオチン 0.05 mg/l の微量要素および有機物質 (Ringe・Nitsch (1968)) を添加したものをを用いた。しよ糖および寒天濃度はそれぞれ 40 g/l, 8 g/l, pH は 5.5 とし、 1.05 kg/cm^2 で 10 分間加圧殺菌した。1 処理区には、10 個の外植組織を用い、処理区として N^6 -ベンジルアデニン(BA)の 0, 0.1, 1 および 5 mg/l と 2, 4-ジクロロフェノキシ酢酸(2,4-D)の 0, 0.1, 1 および 5 mg/l とを組合せた合計 16 区を設けた。植物ホルモンとして用いた BA および 2,4-D は加圧殺菌前に培地に添加した。置床した果実組織は $25-30^\circ\text{C}$, 16 時間日長, 照度 3000 ルックス(白色蛍光灯)の条件下で培養した。培養 4 週間後、カルスの形成状況および外植組織の生長について調査した。果実組織起源のカルスの形成度は、0:カルス形成なし, 1:外植組織表面に少しカルス形成を認めた, 2:外植組織表面全体にカルス形成を認めた, 3:置床時の外植組織と同じ大きさのカルス形成を認めた, 4:置床時の外植組織の 2 倍大のカルス形成を認めた, 5:置床時の外植組織の 3 倍大のカルス形成を認めた, 6:置床時の外植組織の 4 倍大のカルス形成を認めたものとし数字で表わした。引き続き培養を行い、培養 9 週間後にカルスからの器官分化の状況について調査した。一方、培養 4 週間後、形成されたカルスおよび外植組織を FAA(50%エタノール 90:ホルマリン 5:氷酢酸 5 V/V)で固定し、常法により永久標本作製しカルスおよび外植組織の組織学的な差異、さらに器官分化の様相を観察した。

II. 実験結果

イチゴの果実組織を培養した場合、第 1 表にみられるように、多くの場合カルスが形成されるか、あるいは細胞肥大による外植組織の生長が認められたが、外植組織の生長のまったく見られない場合もあった。これは種子を除去した若い果実組織を培養した場合に多く認められた(第 1 図-A)。一方、種子を除去しない若い果実組織を培養した場合には、外植組織は肥大し、やがて赤く着色した(第 1 図-B)。この場合の組織の生長は、細胞の分裂をとまなわない単なる細胞肥大によるものと考えられる。17 日齢の果実組織を培養した場合には、種子の有無にかかわらず、外植組織では細胞分裂はおこらず、細胞が著しく肥大(第 2 図)したために、組織はポップコーン状に破裂(第 1 図-C)する例がほとんどであった。このような組織の生長は若い果実組織で種子を除去し培養した場合にも認められた(第 1 表)。一方、外植組織からのカルス形成は、2, 7, 12 日齢の果実のいずれの場合でも認められた。これらのカルスは、外植組織が培地に接する周辺部より形成される生長の旺盛な白色水浸状のカルス(第 3 図-A)、外植組織表面全体に形成され葉条を分化しうる緑色でかたいカルス(第 3 図-B)および外植組織が培地に接する周辺部より

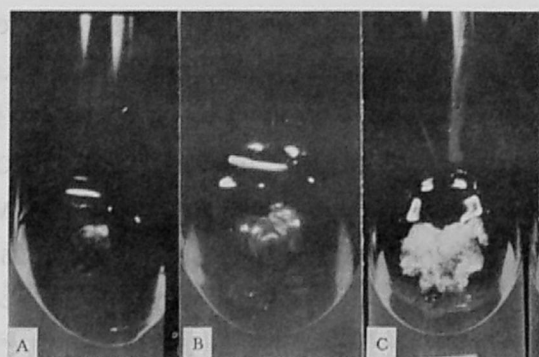


Fig. 1. Three types of cultured strawberry fruit tissues showing no callus formation.

A: No growth.
B: Only cell enlargement.
C: Popcorn-like tissue.



Fig. 2. Cells of popcorn-like tissue

Table 1. Effect of fruit age and plant hormones on callus formation from tissues of strawberry fruits (4 weeks in culture).

Fruit age (days after anthesis)			2			7			12			17		
Presence of achenes			+		-		+		-		+		-	
Callus			Size* Type Color	Size Type Color	Size Type Color	Size Type Color	Size Type Color	Size Type Color	Size Type Color	Size Type Color	Size Type Color	Size Type Color	Size Type Color	
BA	2, 4-D													
Plant hormones (mg/l)	0	0	0 E	0 N	0 E	0 P	0 P	0 P	0 P	0 P	0 P	0 P	0 P	
		0.1	0 E	1 Cd G	0 E	0 E	0 E	0 N	0 P	0 P	0 P	0 P		
		1	3 Cf W	0 P	0 E	0 P	0 N	0 E	0 P	0 P	0 P	0 P		
		5	4 Cf W	0 N	5 Cf W	0 P	0 E	0 E	0 P	0 P	0 P	0 P		
	0.1	0	0 E	0 N	0 E	0 P	0 P	0 P	0 P	0 P	0 P	0 P	0 P	
		0.1	0 E	1 Cd G	0 E	0 P	0 E	0 N	0 P	0 P	0 P	0 P	0 P	
		1	2 Cf W	0 P	0 E	0 N	1 Cu Pg	1 Cu Pg	0 P	0 P	0 P	0 P	0 P	
		5	0 E	0 N	6 Cf W	0 P	1 Cu Pg	1 Cu Pg	0 E	0 P	0 P	0 P	0 P	
	1	0	0 E	0 N	0 E	0 P	0 P	0 P	0 P	0 P	0 P	0 P	0 P	
		0.1	0 E	1 Cd G	0 E	0 P	0 N	0 P	0 P	0 P	0 P	0 P	0 P	
		1	0 N	2 Cd G	0 E	1 Cd G	2 Cu Pg	2 Cu Pg	0 P	0 P	0 P	0 P	0 P	
		5	0 N	3 Cd W	1 Cu Pg	2 Cd G	2 Cu Pg	3 Cu Pg	0 E	0 P	0 P	0 P	0 E	
	5	0	0 E	0 P	0 E	0 P	0 P	0 N	0 P	0 P	0 P	0 P	0 P	
		0.1	0 E	1 Cd G	0 E	0 E	0 N	0 P	0 P	0 P	0 P	0 P	0 P	
		1	0 N	2 Cd G	2 Cu Pg	1 Cd G	2 Cu Pg	2 Cu Pg	0 P	0 P	0 P	0 P	0 P	
		5	0 N	3 Cd W	2 Cu Pg	2 Cd G	2 Cu Pg	3 Cu Pg	0 E	0 P	0 P	0 P	0 E	

* Callus size was classified based on the following criterion.

0: No callus. 1: Small callus from the part of the explant. 2: Small callus from the entire surface of the explant. 3: Callus with the same as the explant. 4: Callus with double the size of the explant.

Cf: Friable callus. Cd: Firm callus formed from the entire surface of the explant. This callus was capable of shoot differentiation. Cu: Firm callus formed around the basal part of the explant. This callus was incapable of shoot differentiation. N: No growth. E: Only cell enlargement. P: Popcorn-like enlargement of the explant due to cell enlargement. W: White. G: Green. Pg: Pale green.

形成され葉条を分化しない白緑色のかたいカルス(第3図-C)の3種類に大別することができる。

白色水浸状のカルスは、2, 7日齢の種子を除去しない果実組織を培養した場合、外植組織が培地に接する周辺部より形成された。2日齢の果実組織の場合、BAが低濃度で2,4-Dが1および5mg/lの区で形成されたが7日齢の果実組織の場合には、BAが低濃度で2,4-Dが5mg/lの区でしか形成されなかった(第1表)。両発育ステージの果実組織ともBAの濃度が1mg/l以上になるとこのカルスは形成されなかった。白色水浸状のカルスを組織学的に観察すると、その組織はだ円形、円形など種々の形をした細胞からなっていた。また、それぞれの細胞が非常に分離しやすい状態になっており(第4図-A), Gautheret(1959)が高濃度のオーキシンの培地でブドウの茎組織を培養した場合に認めたカルス細胞の性状と一致していた。

外植組織表面全体に形成され葉条を分化する緑色のかたいカルスは、2, 7日齢の果実組織を種子を除去し培養した場合にのみ形成された。2日齢の果実組織の場合には、BAおよび2,4-Dの濃度が0および0.1mg/lとかなり低い場合でもこのカルスは形成されたが、7日齢の果実組織の場合には形成されなかった。いずれの場合も、BAおよび2,4-Dの濃度が1あるいは5mg/lと高い区でカルスの形成は良好であった(第1表)。このカルスを組織学的にみると、ほぼ同じ大きさおよび形の細胞で構成されていた(第4図-B)。なお、2日齢の果実組織の場合、2,4-Dの濃度が高くなるにともないカルスの色は次第に白色をおびていった(第1表)。

外植組織が培地に接する周辺部に形成され葉条を分化しない白緑色のかたいカルスは、種子の有無に関係なく12日齢の果実組織を培養した場合に認められることができ、外生の植物ホルモンの濃度によるカルスの性状の相違はみられなかった。BAを添加しない培地および2,4-Dの濃度が0.1mg/l以下の培地では、このカルスはまったく形成されなかったが、BAおよび2,4-Dの濃度が高くなるにともないカルスの形成度は良くなった(第1表)。また、このカルスは7日齢の種子を除去しない果実組織を高濃度のBAおよ

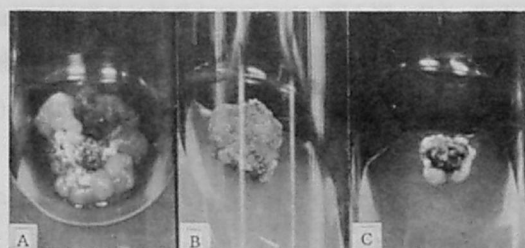


Fig. 3. Three types of callus induced from tissues of strawberry fruits.

- A: White friable callus formed around the basal part of the explant, when the fruit tissue with achenes 7 days after anthesis was cultured on the medium supplemented with 0.1 mg/l of BA + 5 mg/l of 2,4-D for 4 weeks.
- B: Green firm callus formed from the entire surface of the explant, when the fruit tissue without achenes 2 days after anthesis was cultured on the medium supplemented with 0.1 mg/l of BA + 0.1 mg/l of 2,4-D for 4 weeks.
- C: Pale green firm callus formed around the basal part of the explant, when the fruit tissue without achenes 12 days after anthesis was cultured on the medium supplemented with 0.1 mg/l of BA + 1 mg/l of 2,4-D for 4 weeks.

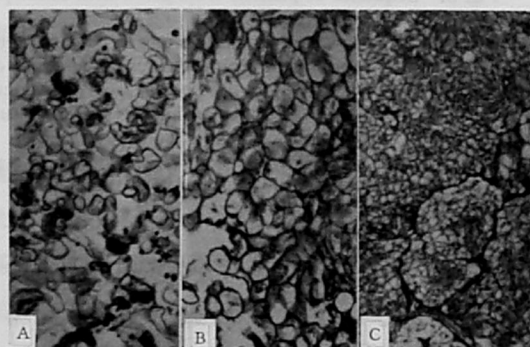


Fig. 4. Three types of callus tissues.

- A: Tissue of white friable callus of Fig. 3-A.
- B: Tissue of green firm callus of Fig. 3-B.
- C: Tissue of pale green callus of Fig. 3-C.

び2,4-Dを添加した培地で培養した場合にも認められた(第1表)。なお、この白緑色のかたいカルスからの葉状の分化は、培養9週間後においても認められなかった。この白緑色の葉条を分化しないカルスを組織学的にみると、葉条を分化する緑色のカルスの細胞(第4図-B)に比べ非常に小さな細胞(第4図-C)で構成されていることがわかった。

外植組織表面に形成される緑色のかたいカルスからの葉条の分化は、上述の2日齢の果実組織あたり数個認められた(第5図-C)。葉条の分化率は培養9週間後で、BA 5 mg/l + 2,4-D 1 mg/l の区で50%

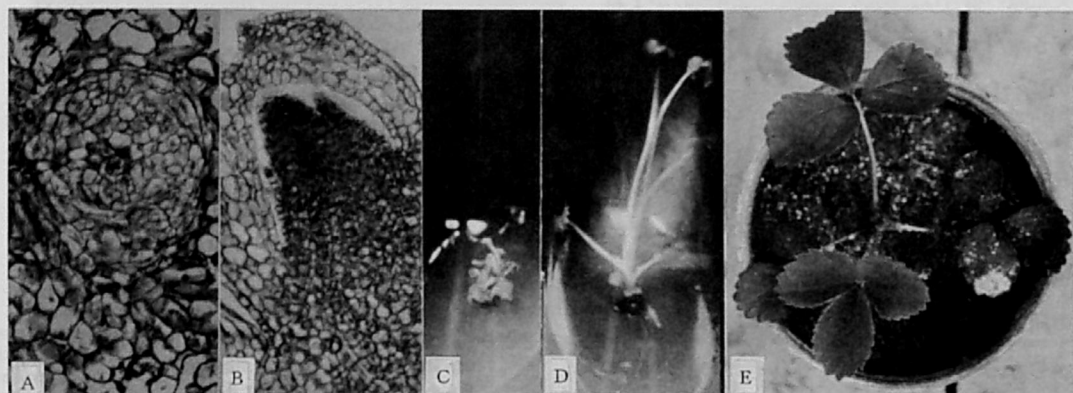


Fig. 5. Sequence of plantlet from green firm callus produced from tissue of strawberry fruits without achenes 2 days after anthesis.

A: A growth center like "nodule" formed in the callus after 4-week culture ($\times 70$).

B: A shoot primordium differentiated in the callus after 5-week culture ($\times 70$).

C: Several shoots on the callus after 8-week culture.

D: A rooted young plantlet after 4-week subculture on the basal medium. The shoots of (C) were individually separated and subcultured.

E: A plant 8 weeks after transplanting to a pot. The plantlet was transplanted to a pot after 4-week subculture on the basal medium.

と最も高く、ついでBA 1 mg/l + 2,4-D 0.1 mg/l およびBA 5 mg/l + 2,4-D 0.1 mg/l の区の40%であった(第2表)。

一方、このカルスから葉条が分化してゆく過程を組織学的にみると培養4週間後には、Stewardら(1958)がニンジン細胞で観察した場合と同様に、周辺の細胞がネスト状になっている細胞群(growth center)をカルス組織内に認めることができた(第5図-A)、この細胞群よりやがて頂端分裂組織が分化し茎頂の形態へと発育した(第5図-B)。培養8週間後には、1外植体あたり数個の葉条を認めることができた(第5図-C)。そして、葉条を分化したカルスを数個に分割し、各個体を植物ホルモンをまったく添加しない基本培地に移植したところ、

Table 2. Effect of plant hormones on shoot formation on the callus from tissue of strawberry fruits without achenes 2 days after anthesis.

Plant hormones (mg/l)		Percentage of shoot formation in 9-week culture*
BA	2,4-D	
0	0	0
	0.1	0
	1	0
	5	0
0.1	0	0
	0.1	0
	1	0
	5	0
1	0	0
	0.1	40
	1	0
	5	0
5	0	0
	0.1	40
	1	50
	5	0

* No. of cultures with shoots/10 cultures $\times 100$

4週間後には葉条が生長し茎葉が大きくなるとともに根が形成され伸長しはじめた(第5図-D)。培養開始から12週間後に根の伸長した幼植物体を素焼鉢に移植したところ、8週間後には普通の大きさの植物体を得ることができた(第5図-E)。

第3節 *in vitro*における果実発育におよぼす心皮および植物ホルモンの影響

I. 実験材料および方法

1971年、京都大学農学部実験圃場で促成栽培中のイチゴ品種“宝交早生”から開花1日前の果実を採取し0.05%のTween 20を含む次亜塩素酸ナトリウム(有効塩素2%)で10分間消毒後、殺菌水で3回洗浄した。これらの果実より、果梗、がく、花弁をピンセットで、心皮を除去する必要がある場合には解剖用ピンで除去し、果実を試験管に20 ml ずつ分注した培地に1個ずつ置床した。1処理区には10個の果実を用いた。

基本培地の組成および果実の培養条件は本章、第2節の場合と同様にした。植物ホルモンとして用いたナフトキシ酢酸(NO₂A)、ナフトレン酢酸(NAA)、ナフトレンアセトアミド(NAAm)、N⁶-ベンジルアデニン(BA)およびマレイン酸ヒドラジド(MH)は、加圧殺菌前に培地に添加した。ジベレリン(GA₃)は、加圧殺菌した培地に Milipore フィルターを通して除菌後添加した。そして、果実の肥大および果実を培地に置床し果実が赤く着色するまでの成熟日数について調査した。

II. 実験結果

オーキシンの影響 : *in vitro* でイチゴ果実を培養した場合、果実の正常な発育を促す植物ホルモンを選択するため、数種の合成オーキシンについて検討した。NAAあるいは、NOA 1 mg/l を添加した培地で果実を培養した場合、果実は正常な形に肥大したが果実基部に多量のカルスが形成された(第6図-A)。一方、NAAm 1 mg/l の場合には、果実基部にカルスの形成は認められなかったが、果実の肥大はよくなかった(第6図-B)。しかし、培地中のNAAmの濃度が10 mg/l になると、果実はNAAあるいはNOA 1 mg/l の場合と同様によく肥大し、果実基部のカルスの形成も認められなかった(第6図-C)。

さて、イチゴ果実を *in vitro* で17日間培養した場合、心皮を除去した果実のNAAmの肥大最適濃度は50 mg/l で、その時の果重は420 mgであったが、心皮を除去しない果実の肥大最適濃度は10 mg/l で、その時の果重は255 mgであった。(第7図)。さらに成熟についてみると、17日間培養した場合、NAAm 50 mg/l の培地で心皮を除去し培養した果実はすでに赤く着色していたが、NAAm

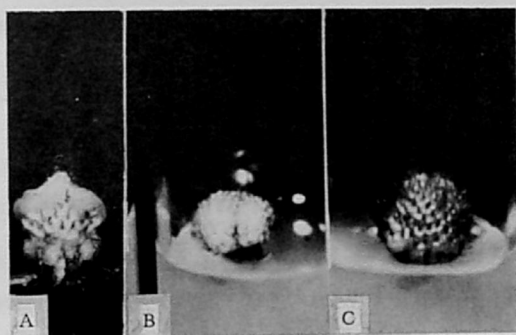


Fig. 6. Effect of auxin on callus formation and the development of strawberry fruits cultured *in vitro* for 17 days.
A: NAA 1 mg/l. B: NAAm 1 mg/l. C: NAAm 10 mg/l.

0, 10 および 100mg/l の培地で培養した果実はそれぞれ白緑色, 白色および桃色であった(第3表)。一方, 心皮を除去しない果実を17日間培養した場合, NAAmのいずれの濃度区の果実も白緑色であった(第3表)。このように, 果実の肥大に対し最適のNAAmの濃度において, 心皮を除去しない果実の肥大および成熟は, 心皮を除去した果実に比べ抑制された。

ジベレリンの影響 : 心皮を除去せずに GA_3 10mg/lのみを添加した培地で開花1日前の果実を14日間培養した場合, 心皮が着生していない基部のみが肥大し, 心皮が着生している果実上部は肥大しなかった(第8図-A)。また, 心皮を除去し GA_3 10mg/lのみを添加した培地で培養した場合でも, もともと心皮の着生していない果実基部は肥大したが心皮の着生していた果実上部はまったく肥大しなかった(第8図-B)。このように心皮を除去した果実の GA_3 に対する反応とNAAmに対する反応とはまったく異なっていた(第8図-C)。しかし, GA_3 10mg/l とNAAm 10mg/lとを添加した培地で果実を培養した場合, 心皮を除去しない果実でも正常に肥大した(第8図-D)。心皮を除去せずに GA_3 とNAAmをそれぞれ10mg/lを添加した培地で17日間培養した果実の重さは, NAAm 10mg/lのみを添加した培地で17日間培養した果実の2倍もあった(第9図)。このように, NAAm 10mg/lを含む培地に GA_3 を添加すると果実の正常な肥大は促進された。一方, 成熟についてみると, 心皮を除去せずに17日間培養した場合, NAAm 10mg/lで GA_3 1および10mg/lを添加した培地での果実はすでに赤く着色していたが, NAAm 10mg/lのみの培地あるいは GA_3 0.1mg/lとNAAm 10mg/lとを添加した培地での果実は, まだ白緑色であった(第4表)。

サイトカイニンの影響 : 培地にBAだけを添加し培養した場合, 果実はまったく肥大しなかったのを,

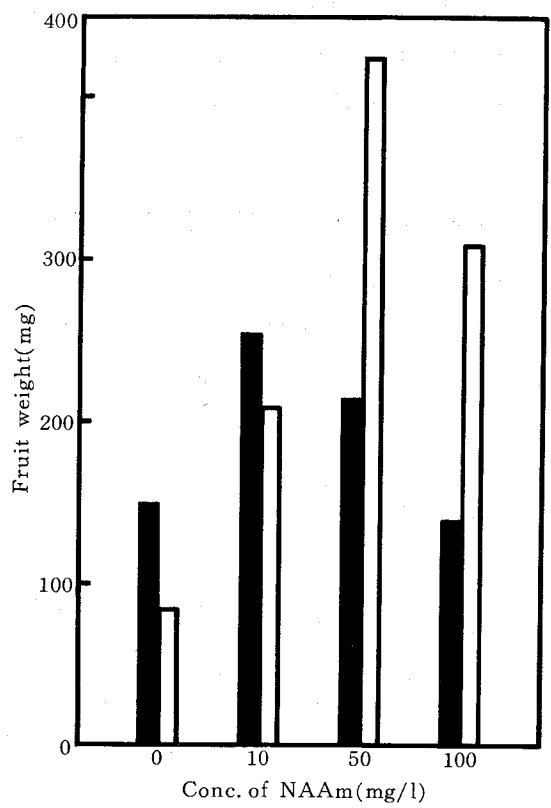


Fig. 7. Effect of auxin on the growth of strawberry fruits after a 17-day culture period.
Blank bar: Fruits without carpels
Solid bar: Fruits with carpels

Table 3. Effect of auxin on the maturing of strawberry fruits after a 17-day culture period.

Conc. of NAAm (mg/l)	Fruit color	
	With carpels	Without carpels
0	Light green	Light green
10	Light green	White
50	Light green	Red
100	Light green	Pink

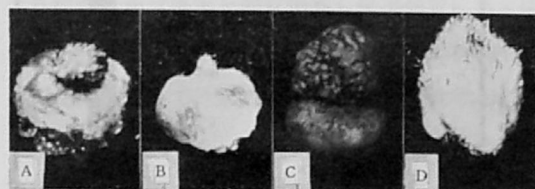


Fig. 8. Comparison of the effects of gibberellin and auxin on the development of strawberry fruits after a 14-day culture period.

- A: Fruit with carpels cultured on the medium with 10 mg/l of GA_3 .
 B: Fruit without carpels cultured on the medium with 10 mg/l of GA_3 .
 C: Fruit without carpels cultured on the medium with 10 mg/l of NAA.
 D: Fruit with carpels cultured on the medium with 10 mg/l of GA_3 and 10 mg/l of NAA.

Table 4. Effect of gibberellin on the maturing of strawberry fruits with carpels after a 17-day culture period. All media were supplemented with 10 mg/l of NAA.

Conc. of GA_3 (mg/l)	Fruit color
0	Light green
0.1	Light green
1	Red
10	Red

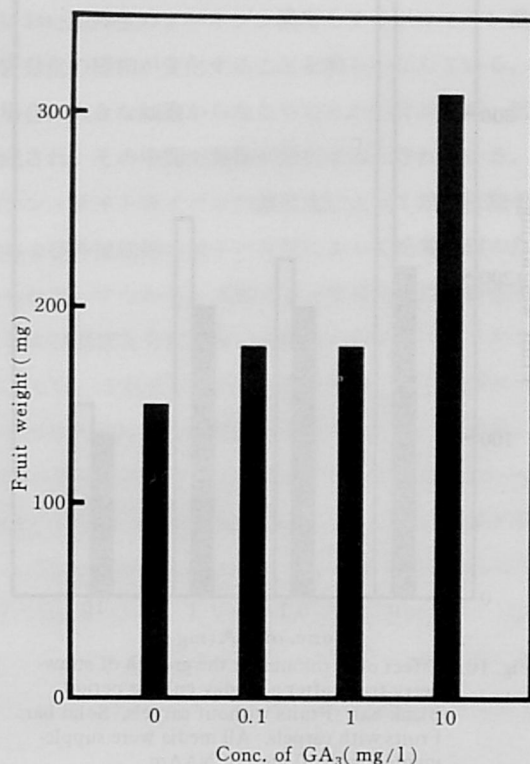


Fig. 9. Effect of gibberellin on the growth of strawberry fruits with carpels after a 17-day culture period. All media were supplemented with 10 mg/l of NAA.

サイトカイニンの影響をみた実験にはすべての培地に NAA 50 mg/l を加えた。果実肥大についてみると、19 日間培養した場合、BA を添加したすべての培地で培養した果実の肥大は、BA を添加しない NAA のみの培地で培養した果実の肥大に比べ抑制された (第 10 図)。この BA による果実の肥大抑制作用は、心皮を除去しない果実より心皮を除去した果実で顕著にあらわれた (第 10 図)。一方、成熟についてみると、BA のいずれの濃度区においても心皮を除去しない果実の成熟日数は、心皮を除去した果実のそれより多かった (第 5 表)。心皮を除去した、あるいは除去しない果実いずれの場合でも、BA を添加した培地で培養すると BA を添加しない培地で培養した場合に比べ成熟日数は多くなった。さらに培地中の BA 濃度が高まるにつれて成熟日数は多くなった (第 5 表)。このように、BA を添加した培地で培養すると、果実の肥大および成熟は抑制されることが明らかになった。

MH の影響 : MH の影響を調べる場合にはすべての培地に NAA 10 mg/l を添加した。MH 0, 1, 10 として 50 mg/l を添加した培地で心皮を除去しないで 24 日間培養した果実の重さは、それぞれ、290 mg, 385 mg, 370 mg, および 490 mg であった (第 11 図)。このように、培地に添加する MH の濃度が高くなるにつれ果

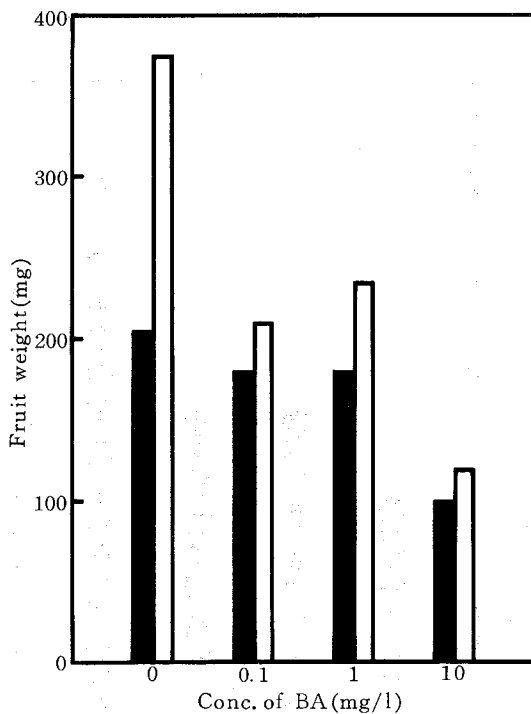


Fig. 10. Effect of cytokinin on the growth of strawberry fruits after a 19-day culture period. Blank bar: Fruits without carpels. Solid bar: Fruits with carpels. All media were supplemented with 50 mg/l of NAAm.

重が大きくなった。これに反し、成熟日数はMH濃度が高くなるに伴い少なくなった(第6表)。また、この時のMHを添加しない培地で培養した果実の種子は緑色であったが、MHを添加した培地、特に 50mg/l の培地で培養した果実の種子は、黒褐色であった。

第4節 考 察

果実組織からのカルス形成におよぼす培地中の植物ホルモンのバランスの影響については多くの報告があるが、逆にカルス形成の様相から果実組織中の植物ホルモンのバランスを論じた研究は少ない。そこで、イチゴ果実の組織を培養し形成されたカルスの性状から果実組織中の植物ホルモンのバランスを推論し、さらに開花

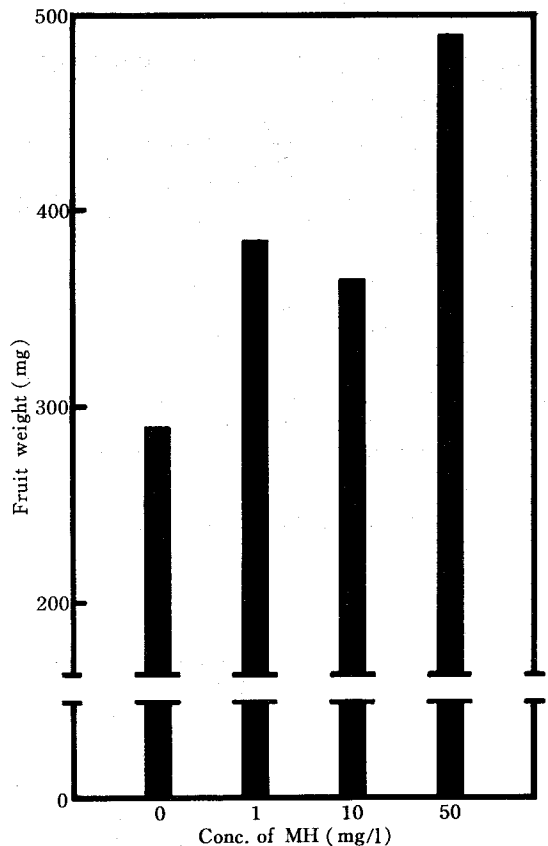


Fig. 11. Effect of MH on the growth of strawberry fruits with carpels after a 24-day culture period. All media were supplemented with 10 mg/l of NAAm.

Table 5. Effect of cytokinin on the maturing of strawberry fruits cultured *in vitro*. Days to maturity: Number of days from explanting to red coloration of the whole surface of the fruits. All media were supplemented with 50 mg/l of NAAm.

Conc. of BA (mg/l)	Days to maturity	
	With carpels	Without carpels
0	30	16
0.1	37	30
1	39	Contaminated
10	>45	>45

Table 6. Effect of MH on the maturing of strawberry fruits with carpels cultured *in vitro*. Days to maturity: Number of days from explanting to red coloration of the whole surface of the fruits. All media were supplemented with 10 mg/l of NAAm.

Conc. of MH (mg/l)	Days to maturity
0	32
1	30
10	29
50	24

1 日前のイチゴ果実を器官培養し果実発育におよぼす種子の影響について論ずる。

Skoog・Miller (1957) は、タバコの髄組織の培養において外生のオーキシシン濃度とサイトカイニン濃度の比率によって、形成されるカルスの性状および器官分化の様相が変化することを明らかにしている。すなわち、オーキシシン・サイトカイニンの濃度比の高い場合に大きな細胞からなるやわらかいカルスが、低い場合に極めて小さな細胞からなるかたいカルスが形成され、その中間で葉条が分化するとされている。本章、第2節で記した実験においても、外生のオーキシシン・サイトカイニンの濃度比によって培養組織の生長が変化し、さらに外植組織を採取する母果実の齢および外植組織の種子の有無によって培養組織の外生植物ホルモンに対する生長反応が異なることが認められた。すなわち、大別すると生長の旺盛な白色水浸状のカルス、器官を分化しうる緑色のかたいカルスおよび器官を分化しない白緑色のかたいカルスの3種類のカルスが形成された(浅平・加納 1977)。このことは、それぞれの外植組織の発育、分化程度によるものであると同時に外植組織の内生の植物ホルモンレベルの差に大きな原因があるものと考えられる。

生長の旺盛な白色水浸状のカルスは、2および7日齢の果実組織を種子を除去せずに、高濃度の2,4-Dと低濃度のBAを添加した培地で培養した場合に形成された。これ以上果実の齢が進んだ、例えば12日齢の有種子の場合、同じ程度の植物ホルモンを与えてもカルスが形成されないか、あるいは形成された場合は外植組織の周辺に葉条を分化しない白緑色のかたいカルスが形成された。このことから考えると、イチゴ果実は発育の初期から中期においては内生のサイトカイニンレベルがオーキシシンレベルに比べて相対的に低く、発育がある段階に進むと逆にサイトカイニンレベルがオーキシシンレベルに比べて相対的に高くなるものと推定される。

外植組織表面全体に形成され葉条を分化しうる緑色のかたいカルスは、2および7日齢の果実組織を種子を除去しBAと2,4-Dがいずれも高濃度の培地で培養した場合に形成される傾向が認められた。これ以上果実の齢が進んだ組織の場合、先に述べたようにこのカルスは形成されず、代りに葉条を分化しえない白緑色のかたいカルスが外植組織の周辺部にのみ形成された。この現象からも先に述べたように、イチゴ果実では齢が進むにつれオーキシシン・サイトカイニンの濃度比が低くなることを推論することができる。また、7日齢の果実の場合、種子を除去し培養した場合は葉条を分化しうるカルスが形成されたが、同程度の植物ホルモンを与えても種子を除去せずに培養した場合は、葉条を分化しえない白緑色のかたいカルスが形成された。一方、種子でサイトカイニンレベルが極めて高いことが数多く報告されている(*Prunus persica*: Powell・Pratt 1964, *Zea mays*: Miller 1967, *Cucurbita pepo*: Gupta・Maheshwari 1970, *Citrullus lanatus*: Prakash・Maheshwari 1970, *Gossypium hirsutum*: Sandstedt 1971, *Oryza sativa*: Oritani・Yoshida 1976)。このことから考えると、種子を除去した場合、外植組織内でのサイトカイニンレベルが低くなるが、種子を除去しない場合にはサイトカイニンレベルが高いために、このような外生植物ホルモンに対する反応が異なるものと推察される。

葉条を分化しえない極めて小さな細胞からなる白緑色のかたいカルスは、7日齢の果実組織を種子を除去せずに、あるいは種子の有無にかかわらず12日齢の果実組織を、いずれも比較的高濃度のBAと2,4-Dを添加した培地で培養した場合に形成された。前述のように、7および12日齢の有種子果実組織は内生のサイトカイニンレベルが高いため、このように器官分化しえないカルスが形成されるものと考えられる。17日

齡の果実組織を培養した場合、いずれの区においてもカルス形成は認められず細胞肥大のみが起った。この組織では、すでに老化が始まり、細胞の分裂能が低下しているものと思われる。Nitschら(1970)もリンゴ Golden Delicious の果実組織を培養した場合、開花30—60日目の果実組織ではカルスは旺盛に生長したが、開花120日目の果実組織では、カルス形成は悪くなったと報告している。

なお、第5図にみられるように緑色のかたいカルスからの葉条の分化過程は、培養カルスが局所的に盛んな細胞分裂を繰り返し、同心円状に細胞が配列する growth center とも言うべき組織を形成することが認められたが、これは Steward ら(1958)がニンジン根のカルスからの器官形成において認めた現象と一致している。

以上の果実組織の培養の結果に対する考察を総合すると、果実組織中のサイトカイニンレベルは、開花7—12日目の發育中期に高くなり、そのレベルは種子において極めて高いことが推察される。

一方、心皮が植物ホルモンの生成の場として果実發育に対してどのような役割を果しているかを調べた。初めに、オーキシンの役割についてみると、Nitsch(1950, 1952)は受精したイチゴ果実の種子を除去し、その代りに β -ナフトキシ酢酸(NOA)を含んだラノリン・ペーストを塗布すると果実は正常に肥大すること、および種子には多量のオーキシンが含まれることを報告した。このように彼はイチゴ果実の發育にとって受精した種子が内生植物ホルモンの点からみると極めて重要な役割を果していることをはじめて実証した。イチゴ果実の器官培養の実験においても、培地に合成オーキシンのひとつである NAAm を添加すれば、心皮の有無にかかわらず、果実は正常に肥大した(Kano・Asahira 1978)。一方、開花前のイチゴ果実にオーキシンを散布処理した場合、果実は単為結果し正常に肥大した(Gardner・Marth 1973, Hunter 1941, Lord・White 1962, Thompson 1964, 1967, 1969)。このように、オーキシンはイチゴ果実を發育させることができるものと考えられる。心皮を除去しない果実の NAAm の肥大最適濃度は心皮を除去した果実のそれよりも低かった(第7図)。Thompson(1964)は、オーキシンによるイチゴ果実の単為結果は、オーキシンにより発達した珠心および珠皮で生成される物質により促進されるとした。Asahiraら(1967)は、トマトでオーキシン処理を行うと珠皮と偽胚が發育しはじめ、子房は単為結果し、単為結果果と受精果中に同程度のレベルの拡散オーキシンが認められたことを報告している。

これらのことより、開花1日前のイチゴ果実を NAAm を添加した培地で培養した場合にも發育中の心皮では、内生オーキシンが生成されているものと考えられる。したがって、心皮を除去しない果実の外生の肥大最適濃度は、外生オーキシンによってのみ肥大していると考えられる心皮を除去した果実のそれよりも低いことは当然のことと思われる。しかし、果実の肥大およびそれに伴う成熟がオーキシンによってのみ制御されていると考えるならば、NAAm の果実肥大最適濃度では心皮の有無にかかわらず肥大および成熟は同じでなければならない。ところが、心皮を除去しない果実の肥大および成熟は心皮を除去した果実のそれらと比べ抑制された(第7図、第3表)。このことは、發育中の心皮では果実の肥大および成熟に抑制的に働く物質が生成されていることを示唆しているものと考えられる。

次に、ジベレリンの作用についてみる。Creasy・Sommer(1964)は GA_3 を添加した培地で未受精心皮を除去しイチゴ果実を培養すると果実は正常に肥大するが、除去しないで培養すると果実は肥大しないことを報告し、未受精心皮中のアンチ・ジベレリン様物質が受精により除去されるため果実は肥大することを示唆した。また、Bajaj・Collins(1968)は未受精心皮を除去しないでイチゴ果実を GA_3 を添加した

培地で培養すると、果実基部は肥大するが未受精心皮の着生している果実上部は肥大しなかったと報告している。これらの結果は、イチゴ果実の未受精心皮ではアンチ・ジベレリン様物質が生成されていることを示しているものと考えられる。しかしながら、本章、第3節で述べたように、心皮を除去しGA₃を添加した培地で培養しても果実上部は肥大しなかった(第8図-B)。このことは、ジベレリンを添加した培地でイチゴ果実が正常に肥大しないのは、未受精心皮で生成されるアンチ・ジベレリン様物質が心皮の着生している果実上部の肥大を阻止しているということを示していない。むしろ、ジベレリンは未受精心皮が着生している果実上部の肥大を誘起し得ないことを示唆している。一方、オーキシシンとジベレリンを添加した培地での果実の肥大および成熟は、オーキシシンのみの培地に比べ促進された(第9図、第4表)。Thompson(1964, 1967, 1969)は、イチゴ果実にオーキシシンとジベレリンの混合液を処理すると、果重はジベレリンの濃度が高くなるにつれ増大したことを報告している。Bajaj・Collins(1968)はジベレリンは*in vitro*培養された果実の成熟を促進する要因のひとつであることを示している。このように、ジベレリンは、オーキシシンと共存する場合イチゴ果実の肥大および成熟を促進するものと考えられる。

最後にサイトカイニンとマレイン酸ヒドラジドの作用についてみる。本章、第3節でBAを培地に添加するとイチゴ果実の肥大および成熟は抑制されたことが示された(第10図、第5表)。Creasy・Sommer(1964)は、カイネチンを添加した培地で培養されたイチゴ果実の肥大は抑制されたことを報告している。Thompson(1964)はまた、インドール酪酸(IBA)とカイネチンの混合液を散布処理したイチゴ果実の肥大および成熟はIBAのみを散布処理した果実より抑制されたことを報告している。本章、第3節で、NAAm培地で心皮を除去し培養されたイチゴ果実の肥大および成熟は、心皮を除去しない果実にくらべ促進された(第7図、第3表)こと、また心皮を除去しない果実をMHを添加した培地で培養すると成熟は促進されたことが示された(第6表)。さらに、MH培地で培養した果実の心皮の色から判断し、心皮の発育が阻害されているものと考えられる。Thompson(1961)は、開花前にMH処理したイチゴ果実の胚珠組織はまったく発育しなかったことを報告している。Asahiraら(1968)は、オーキシシン処理し、単為結果したトマト果実中にも高いサイトカイニンレベルが認められたことを示し、サイトカイニンの生成部位は、オーキシシン処理により発育した珠皮および偽胚であることを示唆している。

これらのことより、NAAm培地で開花1日前のイチゴ果実を培養した場合、サイトカイニンが未受精の心皮でも生成されているものと考えられる。したがって、心皮の除去、あるいはMH処理による心皮の発育阻害によってサイトカイニンは生成されなくなるため果実の肥大および成熟は促進されることになる。Tukey(1936)はドリルで受精したモモ果実の種子を破壊すると果実の肥大および成熟は促進されたことを報告している。Crane・Nelson(1970)はアズズの果実にMHを処理することによって種子の発育を阻害したのちオーキシシン処理を行うと果実の肥大および成熟は促進されたことを実証している。これらのことは、種子の除去、機械的破壊あるいは種子発育の化学的阻害により、果実の肥大および成熟に抑制的に作用する物質が生成されなくなることを示している。したがって、イチゴ果実の肥大および成熟に抑制的に働く物質のひとつはサイトカイニンと考えられる。多くの種類の果実の未熟種子ではサイトカイニンレベルが高いことが報告されている。本章、第2節で開花7-12日目のイチゴ果実の種子でサイトカイニンレベルが高いことが指摘された。

以上より、種子の発育とともにそのレベルが変化するサイトカイニンはイチゴ果実の発育を制御する最も重要な物質のひとつと考えられる。

第5節 摘 要

1. イチゴ果実の組織培養を試み、母果実の齢および外植組織における種子の有無と外植組織から形成されてくるカルスの性状および生長量から母果実中およびその果実組織に付着している種子中のサイトカイニンレベルを推察した。2 および7日齢の果実組織を種子を除去せずに0あるいは0.1 mg/lのN⁶-ベンジルアデニン(BA)と1あるいは5 mg/lの2,4-ジクロロフェノキシ酢酸(2,4-D)を添加した培地で培養した場合には生長の旺盛な白色水浸状のカルスが形成された。

2. 2および7日齢の果実組織を種子を除去し、1あるいは5 mg/lのBAと0.1あるいは1 mg/lの2,4-Dを添加した培地で培養した場合に葉条を分化しうる緑色のかたいカルスが外植組織の表面全体に形成された。

3. 種子を除去しない7日齢の果実組織あるいは種子の有無にかかわらず12日齢の果実組織を0.1あるいは5 mg/lのBAと1あるいは5 mg/lの2,4-Dを添加した培地で培養した場合に極めて小さな細胞からなる白緑色のかたいカルスが外植組織の周辺部に形成されたが、このカルスからは葉状は分化しなかった。

4. 17日齢の果実組織を培養した場合、いずれの区においても細胞肥大のみが起り、カルスの形成は認められなかった。

5. 以上の結果とSkoog・Miller(1957)の結果とを総合すると、イチゴ果実の内生のサイトカイニンレベルは果実発育中期に高くなること、さらにそのレベルは種子中で極めて高いことが推察される。

6. イチゴ果実の発育過程における心皮の役割を植物ホルモンの面から明確にするため開花1日前の果実の*in vitro* 培養を試みた。ナフタレンアセトアミド(NAAm)を添加した培地で心皮を除去した果実を培養した場合、その果実は心皮を除去しない果実と同様に正常な形に肥大した。また、心皮を除去せずに培養した場合、その果実の成熟は心皮を除去した果実にくらべ抑制された。

7. ジベレリン(GA₃)のみを添加した培地で心皮を除去した果実あるいは除去しない果実を培養した場合、いずれも本来心皮の着生していた部分はまったく肥大せず心皮の着生していない果実の基部のみが異常に肥大した。しかし、GA₃とNAAmをともに添加した培地で心皮を除去しない果実を培養した場合、果実は正常な形に肥大し、肥大および成熟はNAAmのみの培地で培養した果実に比べ促進された。

8. BAとNAAmを添加した培地で心皮を除去し、および除去しない果実を培養したいずれの場合もBAの濃度が高くなるにともない果実の肥大および成熟は抑制された。

9. マレイン酸ヒドラジド(MH)とNAAmを添加した培地で心皮を除去しない果実を培養した場合、MHが高くなるにともない果実の肥大および成熟は抑制された。

10. 以上の結果より、イチゴ果実の肥大にはジベレリンよりオーキシンの方が重要であること、および心皮でイチゴ果実の肥大および成熟に抑制的に作用するサイトカイニンが生成されていることが示唆された。

11. 以上を総合すると、心皮あるいは種子で生成され、イチゴ果実の肥大および成熟に抑制的に作用するサイトカイニンのレベルは、果実発育中期に高くなるものと考えられる。

第2章 イチゴ果実の発育におけるサイトカイニンの役割

第1節 緒 言

第1章でイチゴ果実組織および果実そのものを *in vitro* で培養することにより、サイトカイニンレベルは果実の発育中期に高くなること、そして果実の肥大および成熟に抑制的に作用すると考えられるサイトカイニンは主に種子あるいは心皮で生成されていることが示唆された(浅平・加納 1977, Kano・Asahira 1978)。しかし、これらの実験では、イチゴ果実中のサイトカイニンの存在が確かめられているわけではない。

そこで、イチゴ果実の発育における内生サイトカイニンの果す役割をより詳細に検討するため、果実中のサイトカイニン様物質の存在とその生成部位、果実発育に伴う果実中のサイトカイニンレベルの消長と種子の発育との関連性、さらに果実発育と果実中のサイトカイニンレベルにおよぼす植物ホルモンおよび温度の影響について調べた。

第2節 イチゴ果実の内生サイトカイニン様物質

1. 実験材料および方法

果実の採取 : 奈良県農業試験場の圃場で栽培されていたイチゴ苗を1月中旬に掘りあげ実験開始まで -1°C に保たれた室に貯蔵した。そして、イチゴ苗を取り出し素焼鉢に植え 20°C に保たれた自然日長のガラス室に搬入し栽培した。受精を確実にするために開花時に小筆で葯および柱頭をこすり受粉を助けた。開花後 15-20 日間を経過した果実を採取しサイトカイニンの抽出および定量に用いた。

サイトカイニンの抽出、分画およびクロマトグラフィーの方法(第12図) : 一定重量の果実に最終的に

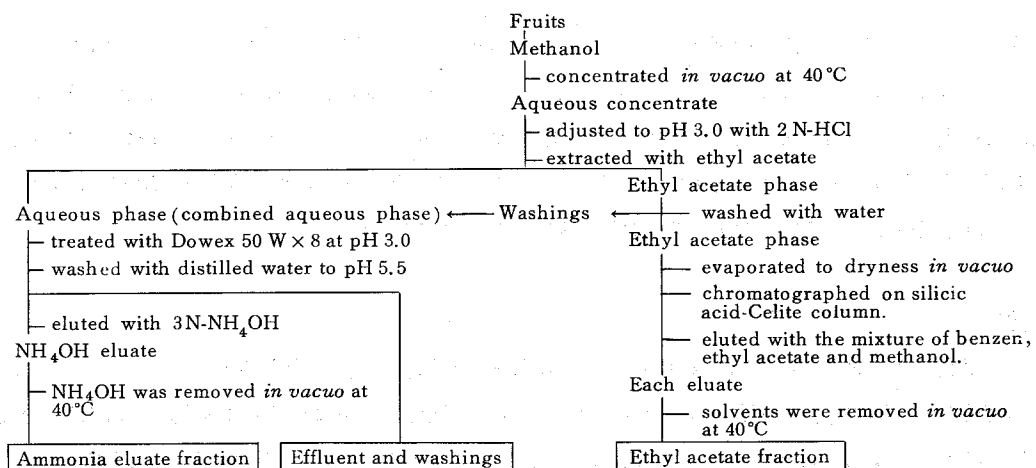


Fig. 12. Fractionation procedure for cytokinins in the extract of strawberry fruits.

80 %メタノールになるように、100 %メタノールを加えブレンダーで磨砕し4℃で24時間抽出後、混合物をろ過し残渣を同様な方法で80 %メタノールで2回抽出した。3回抽出した抽出液をあわせ、減圧下でメタノールを蒸発させて水層まで濃縮し、その水層を2N・HClでpH3.0に調節し酢酸エチルで抽出した後の水層と酢酸エチル可溶性画分を蒸留水で洗浄した洗浄液とを合わせて水層とした。この水層をカチオン交換樹脂のDowex W×8 (H型, 150 メッシュ, 樹脂量: 果実1 gの抽出物に対し1 ml)に20 ml/hrの流速で処理した後、洗浄液のpHが蒸留水のpHと同じになるまで樹脂を蒸留水で洗浄し続けた。水層を樹脂に処理した場合に流出してきた液と樹脂の最初の洗浄液500 mlを合わせ流出・洗浄液画分とした。樹脂に吸着させた活性物質は、用いた樹脂量の3倍量の3Nアンモニア水で溶出した。このアンモニア溶出液中のアンモニアを減圧下で除去し、その水溶液をアンモニア溶出画分とした。さらに、アンモニア溶出画分に含まれるサイトカイニンの種類を調べるため、アンモニア溶出画分を東洋ろ紙No 51 (40×40 cm)にスポットし水飽和n-ブタノールを展開溶媒とし30 cm展開後、そのクロマトグラムを10等分し各Rf値の切片を80 %メタノールで抽出し、減圧下でメタノールを除去後その水溶液を検定に用いた。一方、酢酸エチル画分は、これを減圧下で濃縮乾固した。この画分には、カルス生長に抑制的に作用する物質が含まれていたためこれ以上分画せずに生物検定を行うとカルスはまったく生長しなかったので、濃縮乾固物を第7表に示した

Table 7. Percentage of benzen, ethyl acetate and methanol of each eluate in column chromatography of ethyl acetate fraction.

Elution number Solvents	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Benzen	100	95	90	75	50	25	0	0	0	0	0
Ethyl acetate	0	5	10	25	50	75	100	95	90	50	0
Methanol	0	0	0	0	0	0	0	5	10	50	100

ようなベンゼン・酢酸エチル・メタノールの溶媒系でけい酸・セライトのカラムを用いクロマトグラフィーを行った。そして、各溶出液に蒸留水を加え、その混合液を減圧下で水層にまで濃縮したものを検定に用いた。

生物検定 : イチゴ果実中のサイトカイニンレベルの検定は、ダイズカルスを用いたMiller (1963)の方法にしたがって行った。サイトカイニンのレベルは、基本培地 200 ml 当り果実 100 g の抽出物を添加した濃度で検定した。1区5反復とし各試験管に培地 20 ml ずつを分注した。そして、1.05 kg/cm²で10分間加圧殺菌し冷却後4×4×4 mmの大きさのダイズカルス片を培地上に置床した。置床後、28℃で3000ルクス(白色蛍光灯)の連続光条件下で21日間培養しカルス生重を測定した。

II. 実験結果

イチゴ果実のメタノール抽出物を第12図のように分画した場合、高いサイトカイニンレベルがアンモニア溶出画分および酢酸エチル画分には認められたが、流出・洗浄液画分にはまったく認められなかった。さらに、酢酸エチル画分よりアンモニア溶出画分においてサイトカイニンレベルは高かった(第13図)。

アンモニア溶出画分のサイトカイニンレベルは、カイネチン 0.49 mg/l に相当し酢酸エチル画分の溶出

番号9におけるレベルの5倍のレベルであった。アンモニア溶出画分をさらに水飽和 *n*-ブタノールを展開溶媒として、ペーパー・クロマトグラフィーを行い生物検定を行ったところ、Rf0.2—0.3およびRf0.6—0.8の部分にかなり高いサイトカイニンレベルが認められ、いずれのRf値の部分におけるカルスの生長も対照としたカイネチン0mg/lのそれより良好であった(第14図)。したがって、アンモニア溶出画分にはカルスの生長に阻害的に作用する物質は含まれていないものと考え、以後、次節の実験では、アンモニア溶出画分はペーパー・クロマトグラフィーを行わずにサイトカイニンレベルの生物検定を行った。

酢酸エチル画分では、溶出番号9にカイネチン0.09 mg/l相当のかなり高いサイトカイニンレベルが認められたが、他の溶出番号ではそのレベルは極めて低かった(第13図)。したがって、酢酸エチル画分については1から11のすべての溶出番号の画分のサイトカイニンレベルを検定したが次節以後の実験での酢酸エチル画分についてそのレベルを各実験区間で比較する場合、最も高いレベルが認められた溶出番号9についてのみ検討を加えた。

流出・洗浄液画分についてみると、この画分の溶液を添加した培地でカルスを培養すると、カルスはまったく生長しなかったのでこの画分にはサイトカイニン活性をもつ物質は含まれていないものと考え、以後の実験では生物検定を行わなかった。

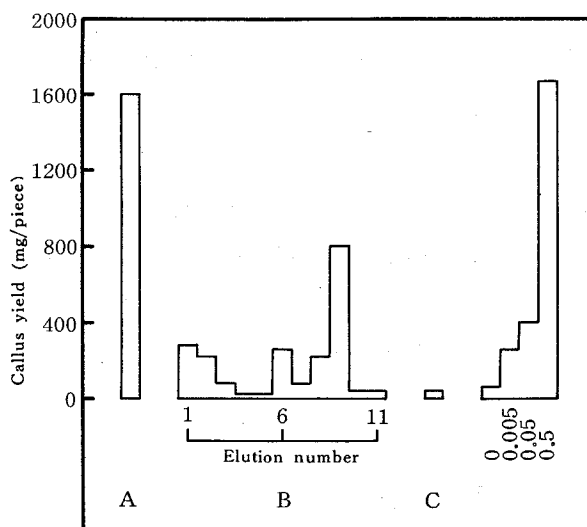


Fig. 13. Cytokinin level of strawberry fruits 15–20 days after anthesis. The level of the extract of 100g fr. wt. of fruits per 200ml of basal medium was bioassayed. A: Ammonia eluate fraction. B: Ethyl acetate fraction: each eluate eluted dryness of ethyl acetate phase on silicic acid-Celite column with mixture of benzen, ethyl acetate and methanol showed at Table 7. C: Effluent and washings. Elution number: Number of each eluate eluted dryness of ethyl acetate phase. The callus was cultured for 21 days.

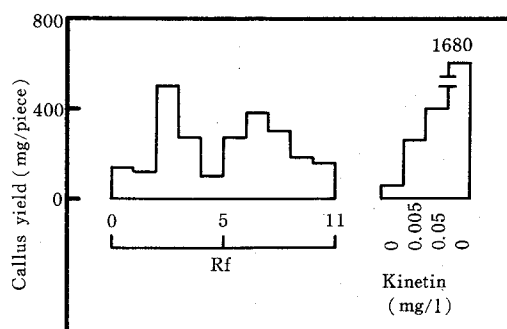


Fig. 14. Cytokinin level of strawberry fruits 15–20 days after anthesis. The ammonia eluate fraction was further paper-chromatographed with water-saturated *n*-butanol. The level of the extract of 50g fr. wt. of fruits per 200ml of basal medium was bioassayed. The callus was cultured for 21 days.

第3節 果実中のサイトカイニンの生成部位

I. 実験材料および方法

本章，第2節の実験材料と同じイチゴ苗を -1°C の室から搬出し，素焼鉢に植え 20°C に保たれた自然日長のガラス室に搬入し栽培した。受精を確実にするために開花時に小筆で葯および柱頭をこすり受粉を助け，開花後15日間発育した果実を採取しサイトカイニンを抽出した。種子を除去した果実（果たく）21 g，種子4 gおよび種子を除去しない果実25 gをメタノールで抽出し本章，第2節の実験方法にしたがい分画し，各画分を基本培地200 mlに添加しサイトカイニンレベルを検定した。カルスの培養は30日間行った。

II. 実験結果

アンモニア溶出画分についてみると，果たく，種子および果実中のサイトカイニンレベルは，それぞれカイネチン 0.006 mg/l ， 0.040 mg/l および 0.045 mg/l に相当した（第15図）。このように，果実全体のアンモニア溶出画分に含まれる総サイトカイニンレベルの87%は種子に，13%は果たくに認められた。

一方，酢酸エチル画分の溶出番号9についてみると，果たく，種子および果実中のサイトカイニンレベルは，それぞれカイネチン 0.0049 mg/l ， 0.013 mg/l および 0.018 mg/l に相当した（第15図）。このように，果実全体の酢酸エチル画分の溶出番号9に含まれる総サイトカイニンレベルの72%は種子に28%は果たくに認められた。

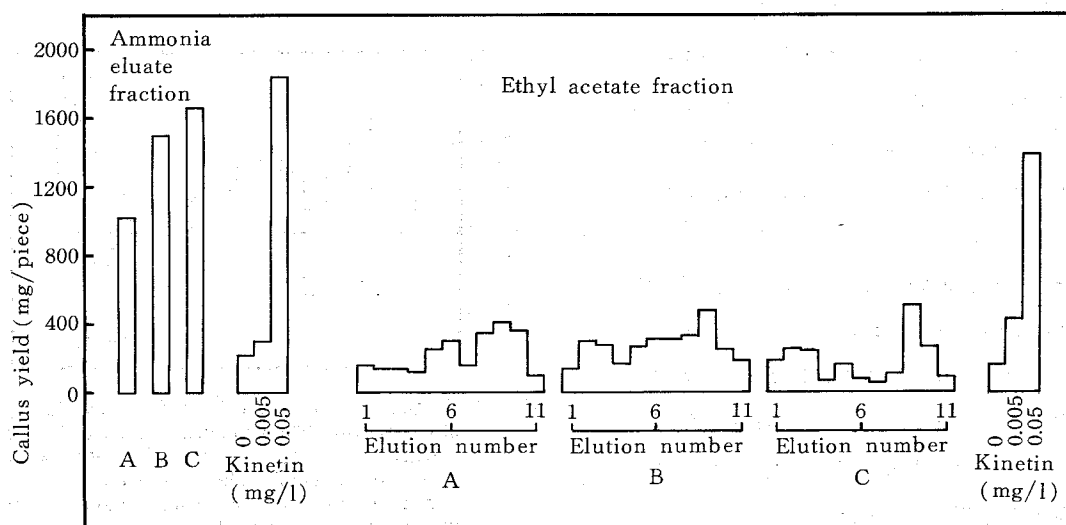


Fig. 15. Comparison of cytokinin levels in receptacles, achenes and whole fruits of strawberry 15 days after anthesis. A: Receptacles. The level of the extract of 21g fr. wt. of fruits whose achenes were removed (receptacles) per 200ml of basal medium was bioassayed. B: Achenes. The level of the extract of 5g of fr. wt. of achenes per 200ml of basal medium was bioassayed. C: Whole fruits. The level of the extract of 25g fr. wt. of whole fruits per 200ml of basal medium was bioassayed. The callus was cultured for 30 days.

第4節 果実発育に伴う果実中のサイトカイニンレベルの消長

I. 実験材料および方法

本章、第2節の実験材料と同じイチゴ苗を -1°C の室から搬出し、素焼鉢に植え前節と同様にして発育した果実を開花5, 10, 15, 20, 25および27日後に採取し果重および着色程度を調査した。また各採取日の果実100gをメタノールで抽出し本章、第2節の実験方法にしたがい分画した後、各画分を基本培地200mlに添加し、サイトカイニンレベルを検定した。カルスの培養は30日間行った。

なお、各採取日の果実を数個FAA液(60%エタノール90:氷酢酸5:ホルマリン5 V/V)で固定した。そして、アルコールで脱水後パラフィンで包埋し回転ミクロームで切片を作製した後、Delafield's hematoxylineおよびEosinで染色し永久プレパラートを作り光学顕微鏡で種子内組織の観察を行った。

II. 実験結果

果実発育 : 開花15日目までは果実はゆっくりと肥大するが、15日目から25日目にかけて急速に肥大し、27日目に成熟し、その時の果重は6.20gであった(第16図)。

果実発育に伴う果実中のサイトカイニンレベルの消長 : アンモニア溶出画分のサイトカイニンレベルは、開花5日目にはすでに高く、開花10日目にはカイネチン0.435mg/l相当で最高となり、その後果実が発育するにつれ減少した(第17図)。一方、酢酸エチル画分の溶出番号9におけるサイトカイニンレベルの果実発育に伴う変化は、上述のアンモニア溶出画分における変化とほぼ同様であったが、レベルの最高値は開花15日目に認められ、そのレベルはカイネチン0.1mg/l相当であった(第17図)。

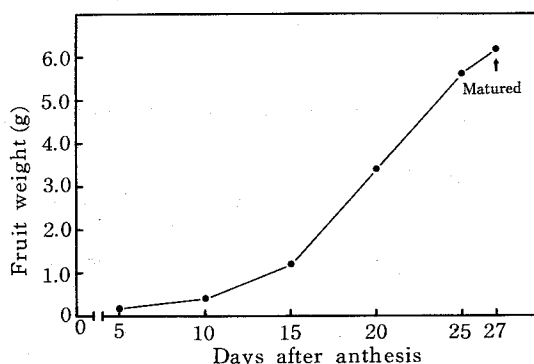


Fig. 16. Growth curve of strawberry fruits grown at 20°C .

果実発育に伴う種子内組織の変化 : 開花5日目では胚珠内はほとんど珠心組織により占められていた(第18図-A)が、10日目になると胚乳は遊離核の状態からすでに細胞壁形成が行われた組織の状態に移っており、胚珠内の大半は胚乳で占められていた(第18図-B)。胚は10日目まではきわめてゆっくり発育したが、10日目からは急速に発育し15日目には胚珠内の約3分の1を占めるに至った(第18図-C)。開花20日目および25日目になると胚のひき続く発育に伴い胚乳は次第に崩壊して消化され、胚珠内はほとんど胚で占められるようになった(第18図-D, E)。

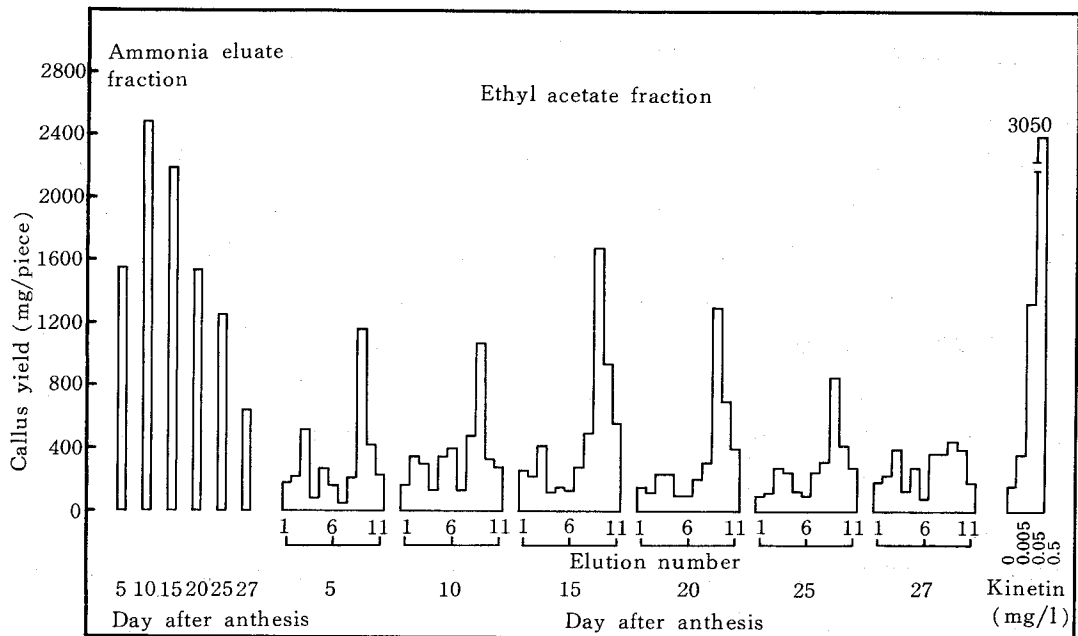


Fig. 17. Changes of cytokinin level during the development of strawberry fruits. The level of the extract of 100g fr.wt. of fruits per 200ml of basal medium was bioassayed. The callus was cultured for 30 days.

第5節 果実の内生サイトカイニンレベルにおよぼすMHの影響

I. 実験材料および方法

京都大学農学部附属農場で半促成栽培中のイチゴ品種“宝交早生”から開花1日前の果実を採取し心皮を除去せずに第1章、第2節に記したと同様の基本培地に NAAm 10 mg/l のみを添加した培地および NAAm 10 mg/l と MH50 mg/l を添加した培地で24日間培養した。その果実10gのメタノール抽出物を本章、第2節の実験方法にしたがい分画後培地20mlに添加しサイトカイニンレベルを検定した。この実験では1区4反復とし、カルスの培養は28日間行った。

II. 実験結果

果実発育および心皮の発育におよぼすMHの影響：これについては第1章、第3節で詳細に述べた。

果実中のサイトカイニンレベル：アンモニア溶出画分では、MHを添加しない培地で培養した果実中のサイトカイニンレベルは、カイネチン 0.42 mg/l 相当であったが、MH 50 mg/l を添加した培地で培養した果実中のサイトカイニンレベルは極めて低かった(第19図)。一方、酢酸エチル画分では、MHを添加した培地および添加しない培地で培養したいずれの果実においてもサイトカイニンレベルは極めて低かった(第19図)。このようにMHを添加した培地で培養した果実中のサイトカイニンレベルは低くなった。

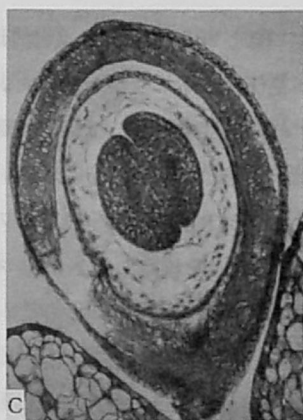


Fig. 18. Anatomical development of the achenes of strawberry fruits grown at 20°C. A: 5 days, B: 10 days, C: 15 days, D: 20 days and E: 25 days after anthesis. Same magnification (x50) in each picture except A (x125).

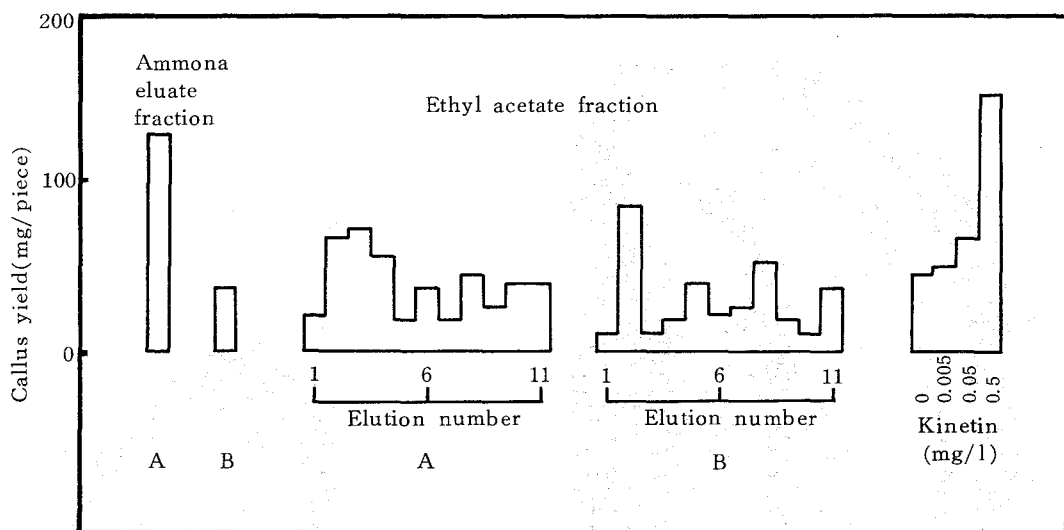


Fig. 19. Effect of MH on cytokinin level in strawberry fruits cultured *in vitro* for 24 days. The level of the extract of 10g fr. wt. of fruits per 20ml of basal medium was bioassayed. A: Fruits cultured on the medium with 10mg/l of NAAm. B: Fruits cultured on the medium with 10mg/l of NAAm and 50mg/l of MH. The callus was cultured for 28 days.

第6節 果実発育および果実中のサイトカイニンレベルにおよぼす温度の影響

I. 実験材料および方法

本章、第2節の実験材料と同じイチゴ苗を -1°C の室から搬出し素焼鉢に植え 20°C に保たれた自然日長の室に搬入し栽培した。受精を確実にするために開花時に小筆で葯および花柱をこすり受粉を助けた。受粉後2日目に植物体の半数を 30°C に保たれた室に搬入した。そして、いずれの温度で発育した果実も開花15日目に採取し、本章、第4節の実験方法にしたがい種子の発育の観察に供試すると同時に本章、第2節の実験方法にしたがい果実中のサイトカイニンの抽出、分画およびクロマトグラフィーを行った。この実験では、果実50gの抽出物を培地200mlに添加した濃度でサイトカイニンレベルを検定した。カルスの培養は21日間行った。

II. 実験結果

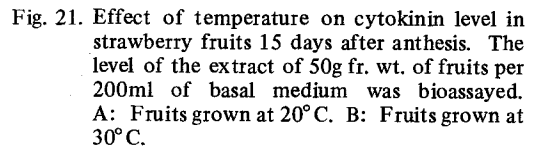
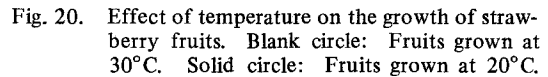
果実発育 : 30°C で発育した果実は 20°C で発育した果実に比べ肥大がはやく、 20°C の果実より8日間はやい開花17日目に成熟した(第20図)。また、成熟時では、 20°C で発育した果実は 30°C で発育した果実より大きかった(第20図)。このように、低温下で発育したイチゴ果実は、高温下で発育した果実に比べ成熟が抑制され、成熟時の果重は大きくなることが明らかになった。

果実中のサイトカイニンレベル : アンモニア溶出画分では、 20°C で発育した開花15日目の果実中のサイトカイニンレベルはカイネチン 0.047 mg/l 相当であったが、 30°C で発育した開花15日目の果実中のそれはその約10分の1しか認められなかった(第21図)。一方、酢酸エチル画分の溶出番号9についてみると、 20°C 区の開花15日目の果実中のサイトカイニンレベルは、カイネチン 0.036 mg/l 相当であったが、

種子發育：20℃で發育した開花15日目の種子では、胚珠内は細胞壁形成が行われた胚乳でほぼ満たされ、胚は心臟型で極めて未熟の状態であった(第22図-A)。一方、30℃区の開花15日目の種子では、胚は發育しほぼ胚珠内を占め、胚乳はほとんど消失し、すでに完熟の状態であった(第22図-B)。このように、低温下で發育した果実の種子では、高温下で發育した果実のそれに比べ發育がおくれることがわかった。

第1章でイチゴ果実の発育に抑制的に作用する植物ホルモンはサイトカイニンであること、およびサイトカイニンは主に種子で生成され果実中のそのレベルは発育中期に高くなることが推

イチゴ果実中に含まれるサイトカイニンの性質を調べるため、イチゴ幼果の抽出液のアンモニア溶出画分をペーパー・クロマトグラフィーを行ったところ、第2章、第2節で示したように高いサイトカイニンレベルがRfs0.2-0.3とRfs0.6-0.8の2か所に認められた。Miller(1965)はトウモロコシ種子の抽出物のRfs0.2-0.3に認められるサイトカイニンの活性をもつ物質はゼアチンのヌクレオチドであろうと推察している。また、Gupta・Maheshwari(1970)はカボチャの種子で、Miller(1967)はトウモロコシの種子で、Rfs0.7-0.9の活性物質はゼアチンか、あるいはゼアチン・リボシドであろうと報告している。以上よりイチゴ幼果の抽出物のアンモニア溶出画分にはゼアチン・ヌクレオチド、ゼアチンおよびゼアチン・リボシドが含まれているものと思われる。さらに、酢酸エチル画分においてもかなり高いサイトカイニンレベルが認めら



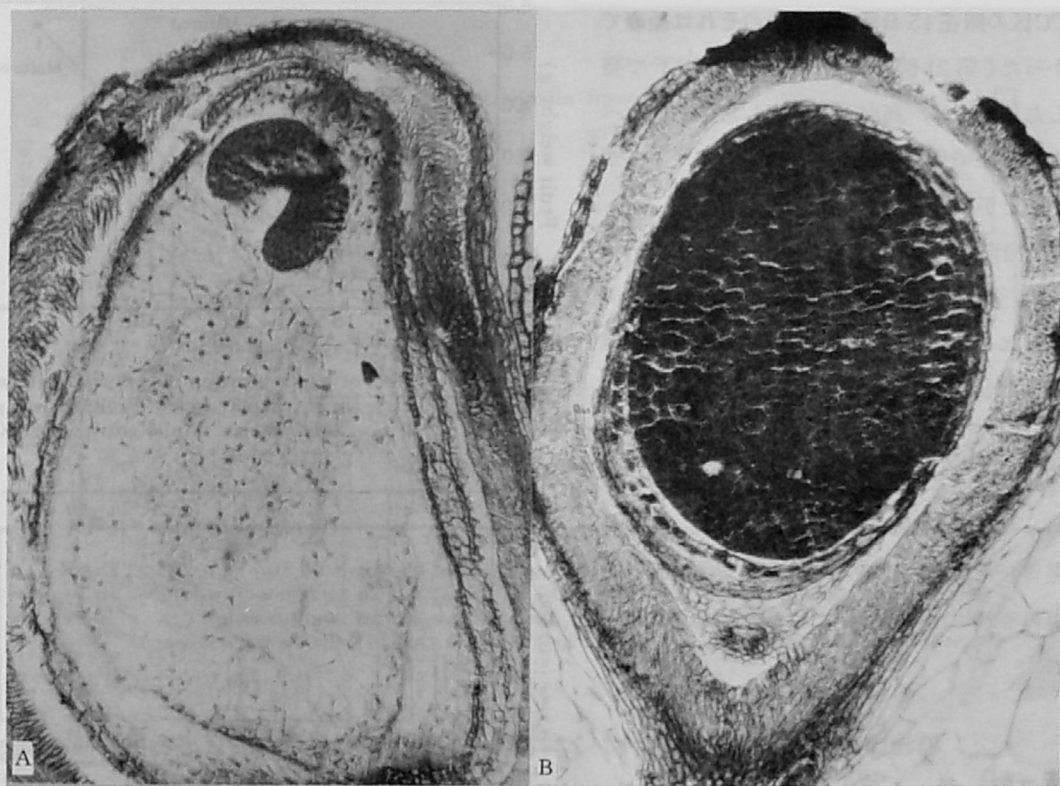


Fig. 22. Effect of temperature on achene development of strawberry fruits 15 days after anthesis. A: The achene of fruits grown at 20°C. B: The achene of fruits grown at 30°C. Same magnification (x100) in each picture.

れた。Asahiraら(1968)は、トマト幼果の抽出物を酸性にし、これを酢酸エチルで分画した時の酢酸エチル画分においてもサイトカイニンレベルが高いことを報告している。さらに、Koshimizuら(1976)は上述の活性物質のクロマトグラム上のRf値、あるいは化学的特性から、この物質は6-アミノプリン関連物質とはまったく異なり、カルボキシル基、グリコール基およびその他の酸化基をもったエステルを含有するまったく新しい形の細胞分裂促進物質であろうと指摘している。イチゴ果実の抽出物の酢酸エチル画分中のサイトカイニン様活性物質については上述のような詳細な分析はなされていないが、この物質はトマト幼果抽出物中の活性物質と同じものであろうと考えられる。

このように、イチゴ果実中にはサイトカイニンおよびサイトカイニン様物質が存在することが示されたが、第1章、第2節で、サイトカイニンレベルは種子で高いことが示唆されたため、これを確証する実験を行ったところ果実中のサイトカイニンの大部分は種子に含まれることが示された(Kano・Asahira 1979)。Letham・Williams(1969)はリンゴ果実で高いサイトカイニンレベルは果肉でなく種子で認められたことを報告している。さらに、発育中の種子が果実中のサイトカイニンの生成部位であることが多数報告されている(*Zea mays*: Miller 1965, *Persea americana*: Blumenfeld・Gazit 1970, *Cucurbita pepo*: Gupta・Maheshwari 1970, *Citrullus lanatus*: Prakash・Maheshwari 1970)。第1章の果実の*in vitro*培養実

験でイチゴ果実中のサイトカイニンの大部分は種子で生成されていることが示唆された(Kano・Asahira 1978)。これらのことより、イチゴ果実では種子がサイトカイニンの生成部位と考えられる。

第1章、第2節の結果からイチゴ果実では発育中期に果実中のサイトカイニンレベルは高くなることが推察された(浅平・加納 1977)。そこで、発育に伴う果実中のサイトカイニンレベルを調べたところ、本章、第4節の結果で示したごとく果実中のサイトカイニンレベルは開花後10-15日目に最高となり、その後発育し成熟に近づくにつれ減少した。すでに述べたように、イチゴ果実中のサイトカイニンレベルの大部分は種子で認められるという事実から発育に伴う果実中のサイトカイニンレベルの消長は種子の発育と深い関係があると考えられる。そこで、発育に伴う種子内組織の変化を組織学的に観察したところ、第2章、第4節で示したように開花10-15日目の種子の胚珠内は胚乳で占められていたが、その後胚は徐々に発育し25日目には胚珠内はほぼ完全に胚で占められ種子は完熟の状態になっていた。

一方、開花1日前の果実を*in vitro*で単為結果を誘起し培養した第1章、第3節の実験で、心皮を除去しない果実の成熟は、心皮を除去した果実に比べ抑制されたこと(Kano・Asahira 1978)から、単為結果した果実の種子もまたサイトカイニンの生成の場であることが示唆される。Thompson(1964)は、単為結果したイチゴで果実の種子では少なくとも果実発育前半期で珠心および珠皮が急速に生長することを示し、さらにこれらの組織が果たぐの肥大促進物質の生成の場であることを指摘している。また、Asahiraら(1968)は、オーキシン処理により単為結果したトマト果実でもサイトカイニンレベルが高いことを認めたことからサイトカイニンはオーキシン処理により発育した珠皮あるいは偽胚で生成されていることを示唆している。したがって、受精し発育した果実でも、単為結果した果実のいずれの場合でも、果実の肥大および成熟に抑制的に作用するサイトカイニンは胚珠の発育初期から中期に活発に生成され、胚珠の発育の停止あるいはその発育の完熟に伴い、その生成量は減少するものと考えられる。そこで、種子が完熟するにつれ果実中のサイトカイニンレベルは低くなり、その結果、果実は肥大し成熟に至るものであろう。

はじめに、果実の発育におよぼす温度の影響についてみると、本章、第6節で示したごとく20℃で発育した果実は、30℃での果実よりも成熟が遅れた。また、開花15日目の果実中のサイトカイニンレベルは30℃の果実より20℃の果実で高かった(Kano・Asahira 1979)。Blumenfeld・Gazit(1970)は、アボガドの中生品種の果実の果皮中のサイトカイニンレベルは、早生品種のそれに比べ長い間高く保たれていたと報告している。さらに、第1章、第3節ではサイトカイニンを添加した培地で開花1日前の果実を*in vitro*培養すると成熟が遅れることを示した(Kano・Asahira 1978)。以上より、サイトカイニンレベルが高い果実では成熟は抑制されることが考えられる。一方、20℃で発育した開花15日目の果実の種子の胚珠内は細胞壁の形成が行われた胚乳で占められていたが、30℃のでは胚で満たされていた。したがって、20℃で発育した果実は種子の発育が遅れ、遅くまで高いサイトカイニンレベルが果実中に維持されているため成熟が遅れるものと考えられる。以上より、イチゴ果実の発育は環境条件によって種子の発育に影響される結果、種子中のサイトカイニン生成が変化し、そして果実中のサイトカイニンレベルがコントロールされるため、果実の発育は制御されるものと考えられる。

次に、細胞分裂を阻害するといわれるMHを培地に添加し、開花1日前の果実を培養したところ、本章、

第5節に示したように、その果実の肥大および成熟は促進され果実中のサイトカイニンレベルは極めて低かった。なお、心皮の発育についてみるとMHを添加した培地で培養した果実の心皮は暗褐色であった。Thompson (1963)は開花3日前のイチゴ果実にMH処理を行うと、胚は形成されず珠心の崩壊が認められたことを報告している。さらに、Crane・Nelson (1970)はアンズ果実にMH処理すると果実の成熟は促進され無種子果実が形成されることを示している。以上より、開花1日前の果実をMHを添加した培地で培養した場合、胚珠の組織の発育はかなり阻害されているものと考えられる。これらより、MHを添加した培地で開花1日前の果実を培養すると、MHにより珠心あるいは、珠皮の発育が妨げられるためサイトカイニンが生成されず、したがって果実中のサイトカイニンレベルが低下し果実発育が促進されるものと考えられる。

第8節 摘 要

イチゴ果実の発育と果実中のサイトカイニンレベルとの関連性をより明確にするため、果実中のサイトカイニン様物質の種類の探索、種子および果たく中のサイトカイニンレベルの比較および果実発育に伴う果実中のサイトカイニンレベルの消長と果実発育に伴う種子内組織の変化との関係を調べた。さらに、果実発育を制御していると思われる諸要因が種子発育あるいは果実中のサイトカイニンレベルにおよぼす影響について調べた。

1. イチゴ果実のメタノール抽出物を酢酸エチルで分画した場合、残った水層をカチオン交換樹脂に処理した後、アンモニア水で溶出したアンモニア溶出画分をペーパー・クロマトグラフィーを行ったところ、Rf値の異なった2か所でサイトカイニンレベルが高かった。一方、酸性での酢酸エチル可溶性画分のカラム・クロマトグラフィーを行ったところ、この画分にも高いサイトカイニンレベルが認められた。

2. イチゴ果実全体に含まれる総サイトカイニンレベルの約70%は種子に、残りの約30%は果たくに認められた。

3. イチゴ果実中のサイトカイニンレベルは開花10-15日目の発育中期に最高となりその後果実が成熟するにつれ低下した。一方、種子発育についてみると、開花5日目の種子の胚珠内は主に珠心組織で占められていたが、開花10-15日目になると胚珠内はほぼ胚乳により満たされていた。そして、成熟に近い開花25日目では、胚珠内はほぼ胚で占められていた。

4. 20℃で発育したイチゴ果実は、30℃の果実より成熟が遅れた。開花15日目の果実中のサイトカイニンレベルは、30℃の果実より20℃の果実で高かった。この時期の20℃の果実の種子の発育は30℃の果実の種子より遅れており未熟の状態であった。

5. MHを添加した培地で培養した果実の発育は、MHを添加しない培地で培養した果実に比べ促進された。24日間培養した場合、MH添加区の果実ではMH無添加区の果実に比べ果実中のサイトカイニンレベルは極めて低かった。MH添加区の果実の心皮の色は暗褐色であったが、MH無添加区の果実の心皮の色は緑色であった。

6. このように、イチゴ果実中のサイトカイニンレベルは果実が若い時、すなわち種子が未熟な時には

高いが、種子が完熟するにつれ種子内でのサイトカイニン生成量が減少し、果実は成熟するものと考えられる。したがって、種子の発育を遅らせる条件下では、種子のサイトカイニン生成が長く保たれるため、果実発育は抑制されるが、種子の発育を停止させるか、あるいは種子が早く発育を完了するような条件下では、種子のサイトカイニン生成が低下するため、果実発育は促進されるものと考えられる。

第3章 イチゴ果実の発育における ABA の役割

第1節 緒 言

第1章、第3節でサイトカイニンを添加した培地で培養した果実の成熟は抑制されることが示された (Kano・Asahira 1978)。さらに第2章、第4節でイチゴ果実の発育後期になると内生サイトカイニンのレベルは低下し成熟が促進されることが明らかにされた (Kano・Asahira 1979)。また、他の多くの果実についても果実が成熟に近づくとき果実中のサイトカイニンレベルが低下することが報告されている (*Prunus domestica* : Letham 1964, *Zea mays* : Miller 1967, *Cucurbita pepo* : Gupta・Maheshwari 1970, *Gossypium hirsutum* : Sandstedt 1971)。これらのことより、果実の発育後期になると成熟に抑制的に作用するサイトカイニンのレベルが低下するため、成熟が促進されるものと考えられる。

他方、多くの果実で果実の発育後期になるとアブサイシン酸 (ABA) のレベルが高くなること、および果実の成熟はABAにより制御されていることが報告されている (*Solanum lycopersicum* : Dörffling 1970, *Malus pumila* : Rudnicki・Pieniazek 1970, *Gossypium hirsutum* : Davis・Addicott 1972, *Pyrus communis* : Gilら 1972, *Vitis vinifera* : Coombe・Hale 1973, 稲葉 1975)。しかし、イチゴ果実の発育とABAの関連性についてはあまり研究されていない。そこで、本章では、はじめに果実発育に伴う内生のABAレベルの消長、果実発育に影響をおよぼす諸要因と内生ABAの関係および果実発育に対するABAの作用について調べた。

さらに、上述した果実発育とサイトカイニンあるいはABAとの関連性を調べた報告では果実発育におけるこれら2つの植物ホルモンの相互作用についてまったく研究されていない。そこで、本章ではイチゴ果実の発育におけるその相互作用についても研究を試みた。

第2節 果実発育に伴う内生抑制物質レベルの消長

I. 実験材料および方法

果実の採取 : 奈良県で1977年1月中旬に入手したイチゴ苗を -1°C に保たれた室に貯蔵し、実験開始時にイチゴ苗を取り出し素焼鉢に植え 20°C に保たれた自然日長の室に搬入し栽培した。受精を確実にするため開花時に小筆で葯および柱頭をこすり受粉を助けた。受粉後2日目にイチゴ苗の半数を 30°C に保たれた自然日長の室に搬入し栽培し、開花後種々の日数を経過した果実を採取し抑制物質の検定に用いた。

抑制物質の抽出、分画およびクロマトグラフィーの方法 : 最終的に80%メタノール溶液になるように、果実抽出物に100%メタノールを加えブレンダーで磨砕し、 4°C で24時間抽出後その混合液をろ過した。そして、その残渣を同様な方法で80%メタノールで2回抽出した。3回抽出した抽出液をあわせ減圧下

でメタノールを除去し水溶液になるまで濃縮し $2N \cdot HCl$ で pH 3.0 に調節後、酢酸エチルで 3 回抽出した。そして、酢酸エチル可溶性画分より果実 1g に相当する量を分取し減圧乾固したのち、東洋ろ紙 No. 51 ($2 \times 40 \text{ cm}$) にスポットし、イソ-プロパノール : 28% アンモニア水 : 水 (10:1:1 V/V) を展開溶液とし 20°C で 20cm 展開後ペーパーを乾燥し、そのクロマトグラムを 10 等分した。

抑制物質の同定 : 成熟した果実の酸性メタノール抽出物の酢酸エチル画分から果実 4g 相当を上述したと同様な方法で抽出分画後、ペーパー・クロマトグラフィーを行った。そして、抑制物質が存在すると考えられる R_f 0.5—0.9 の部分を切り取り、80% メタノールで抽出後、セファデックス・LH-20 を用い、Eliasson (1969) の方法にしたがい 0.001M の HCl を含む 96% エタノールを展開溶媒とし、8ml/hr の流速でクロマトグラフィーを行った。溶出液は 10ml ずつ採取し、そこから 8ml を試験管に分取し風乾後、抑制物質の生物検定を行った。一方、標品の ABA 40mg/l の溶液 1.5 ml を上述した Eliasson (1969) の方法でクロマトグラフィーを行い、各溶出液 10ml から 8ml を分取し風乾後、ABA の生物検定を行った。

抑制物質の生物検定方法 : イネ品種“短銀坊主”の種子を 1% 次亜塩素酸ナトリウム水溶液で 10 分間消毒後、水洗し、水に浸漬し 25—30°C で 3 日間インキュベートして催芽させた。ペーパー・クロマトグラフィーを使用した場合には、10 等分した各 R_f 値の乾燥した切片と蒸留水 1ml を入れた試験管に催芽したイネ種子 7 粒を投入した。一方、セファデックス・LH-20 を使用した場合には、分取した各溶液を試験管内で風乾後、蒸留水 1ml と催芽したイネ 7 粒を投入した。そして、30°C、全日長、照度 3000 ルックス (白色蛍光灯) の条件下で 7 日間インキュベートした後、イネ種子の第 2 葉鞘の長さを測定した。

II. 実験結果

果実発育 : 20°C で発育したイチゴ果実の場合、開花 15 日目では果色は白緑色で果重は 1.72 g であった。その後急速に肥大し 17 日目になると種子と種子との間に白緑色の果肉が認められた。22 日目になると果実基部が赤く着色し果重は 7.50 g となり、28 日目に果実は成熟し、その時の果重は 7.85 g であった (第 23 図)。一方、30°C で発育したイチゴ果実では、開花 15 日目の果色は白緑色で果重は 3.70 g であった。18 日目には果実の表面の半分が赤く着色した。そして 20 日目には果実は成熟しその時の果重は 7.20 g であった (第 23 図)。このように、30°C で発育した果実の肥大および成熟は、20°C で発育した果実に比べ促進された。

果実発育に伴う内生抑制物質レベルの消長

: 20°C 区の果実では、開花 15、20 日目には抑制物質の活性は認められなかったが、25 日目になると R_f 0.6—0.8 に低いレベルで認めら

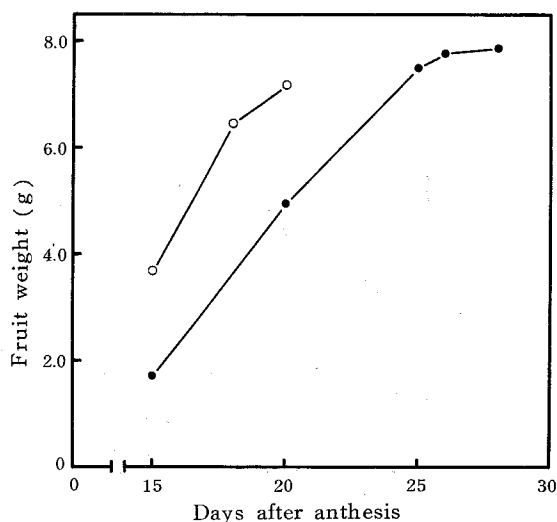


Fig. 23. Effect of temperature on the growth of strawberry fruits. Blank circle: Fruits grown at 30°C. Solid circle: Fruits grown at 20°C.

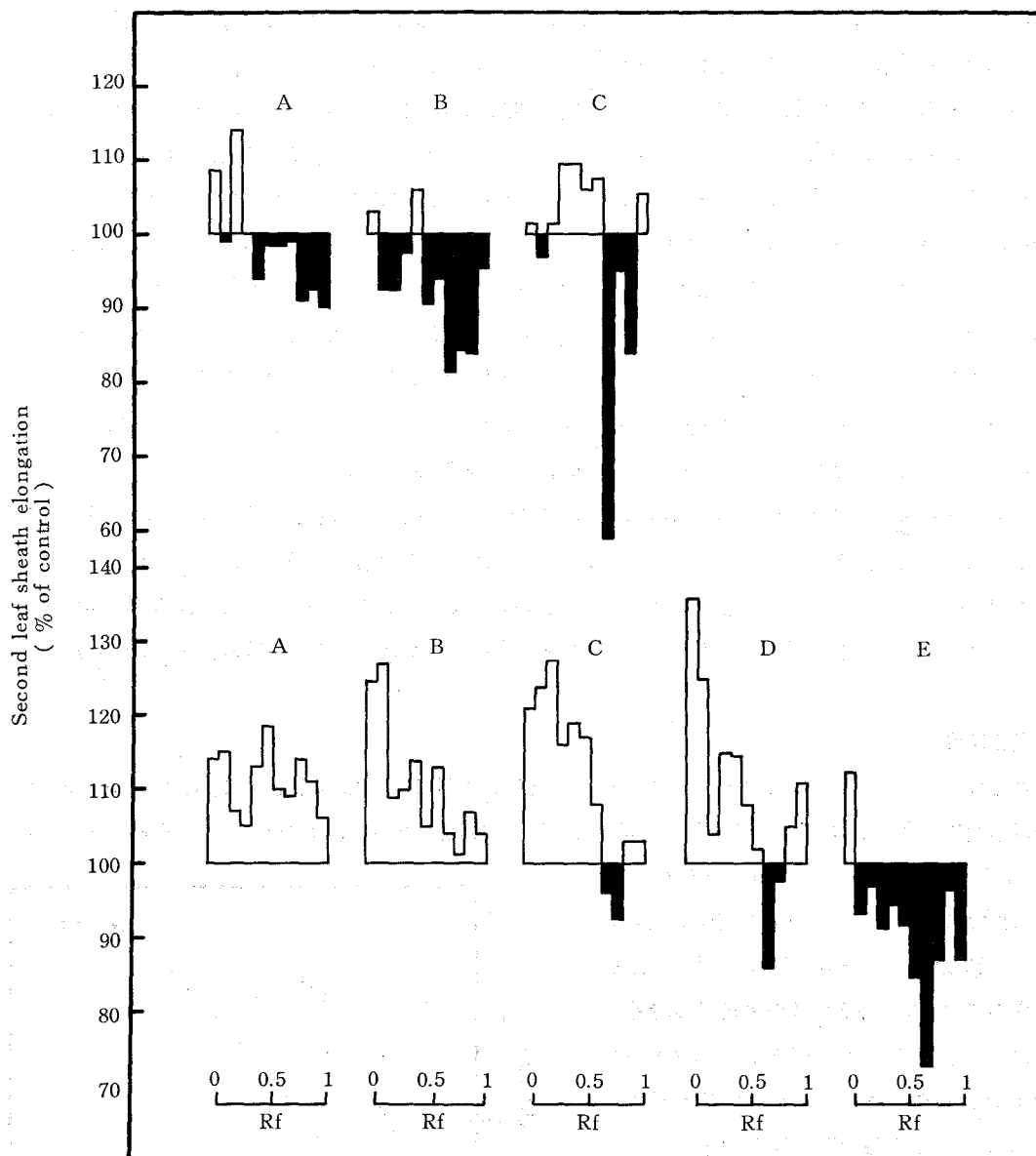


Fig. 24. Changes of ABA level of strawberry fruits with their development grown at 20°C and 30°C. The level of the ethyl acetate soluble layer of an acidified methanol extract representing 1g fr.wt. of strawberry fruits was bioassayed with the rice seedling test following PC with *iso*-propanol: 28% NH_4OH : Water (10 : 1 : 1 V/V) as the solvent. Cultivar "Tanginbozu" was used for the bioassay. Top: Fruits grown at 30°C for 15 days (A), 18 days (B) and 20 days (C). Bottom: Fruits grown at 20°C for 15 days (A), 20 days (B), 25 days (C), 26 days (D) and 28 days (E).

れた。26日目にはそのレベルは高くなり、さらに28日目の成熟時にはレベルはきわめて高くなった(第24図)。一方、30℃区の果実では、開花15日目にはすでに抑制物質のレベルは高く、成熟する開花20日目まで、その物質のレベルは増大し続けた(第24図)。このように、イチゴ果実中の抑制物質のレベルは、果実が発育し成熟に近づくに伴い増大した。さらに、30℃区の果実では、20℃区の果実に比べ果実発育早期に果実中の抑制物質のレベルが高くなった。そこでイチゴ果実中の抑制物質を同定するため、酸性のメタノール抽出物の酢酸エチル可溶性画分のペーパー・クロマトグラフィーを行った。そして、高い抑制物質のレベルが認められたRf 0.5-0.9の部分をメタノールで抽出し、さらにセファデックス・LH-20でクロマトグラフィーを行ったところ、標品のアブサイシン酸(ABA)と同じ第5および第6番目のフラクションで伸長抑制が極めて強くあらわれた(第25図)。

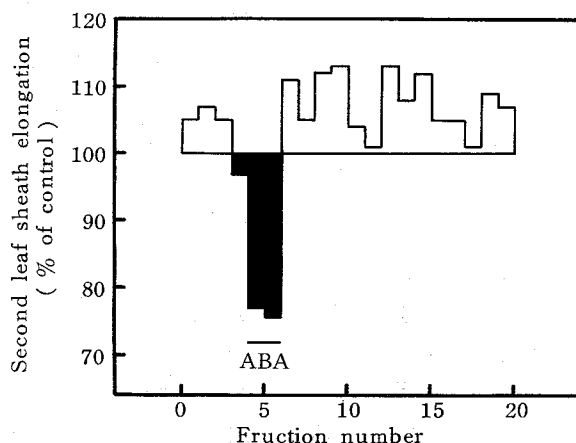


Fig. 25. Rice seedling bioassay of the ethyl acetate soluble layer of an acidified methanol extract representing 4g fr.wt. of matured strawberry fruits. The methanol extract of Rfs 0.5-0.9 on paper-chromatogram were further chromatographed on Sephadex LH-20 with 96% ethanol containing 0.001M HCl. Cultivar "Tanginbozu" was used for the bioassay.

第3節 果実発育におよぼすABAの影響

I. 実験材料および方法

開花1日前の果実を栄養培地で培養した場合と成熟前の果実をシャーレ内で保藏した場合における果実成熟におよぼすABAの影響について調べた。

果実培養 : 開花1日前の果実を前節のごとく栽培したイチゴ苗から採取し、第1章、第2節に記したと同様の基本培地にNAAm 10 mg/l, NAAm 10 mg/l + ABA 1 mg/l, NAAm 10 mg/l + ABA 10 mg/l および NAAm 10 mg/l + ABA 50 mg/lを添加した培地に第1章、第3節の実験方法にしたがい心皮を除去せずに果実を置床した。そして、25-28℃, 16時間日長, 照度 3000 ルックス(白色蛍光灯)の条件下で果実を培養し、果実の肥大様相と成熟日数(置床から果実が赤く着色し成熟するまでに要する日数)を調べた。

果実保藏 : 前節のごとく栽培したイチゴ苗より、開花12日目の果実(緑色果), 15日目の果実(白緑色果)および20日目の果実(白色果)を採取し、洗浄後直径17 cm, 高さ5 cmの大きさのシャーレにABA 0, 100 および 500 mg/lの溶液を十分にしみ込ませたろ紙をしき、その上にかく、果梗を切除した果実を切断面を下にして静置した。そして果実培養と同様の条件下で培養し、置床から果実が赤く着色するまでの日数を調べた。

II. 実験結果

果実培養 : 培養19日目ではABA 50 mg/lを添加した培地で培養した果実は赤く着色し果重は410 mgで

あった。さらにABA 0, 1, および 10 mg/l を添加した培地で培養した果実はまだ着色しておらず、重さは、それぞれ 270, 250 および 260 mg であった (第 26 図)。各処理区の果実が成熟した時の果実は、いずれの区でも、410mg から 470mg の間の重さで処理間にあまり大きな差は認められなかった (第 26 図)。さらに、果実の成熟についてみると、ABA 0, 1, 10 および 50 mg/l を添加した培地で培養した果実の成熟日数はそれぞれ 32, 32, 24 および 19 であった (第 27 図)。このように、成熟時の果重はABAによって増大されなかったが、成熟は促進された。

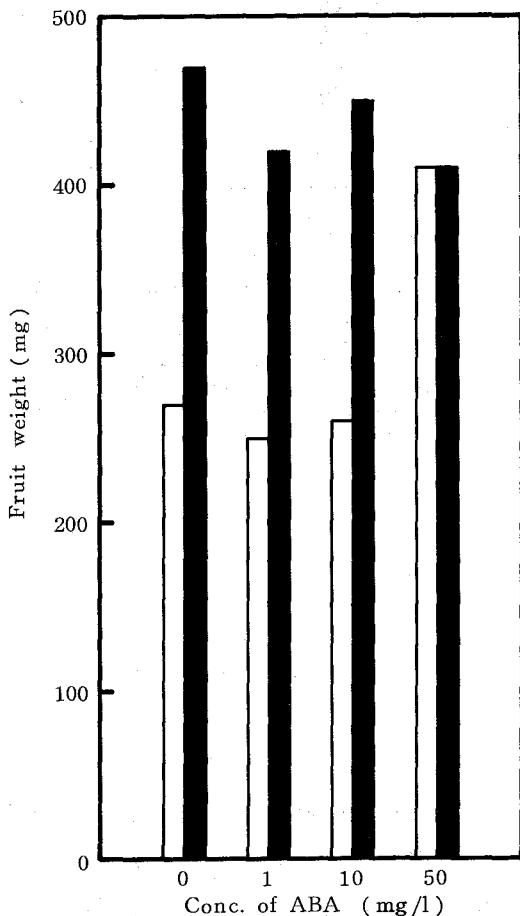


Fig. 26. Effect of ABA on the growth of strawberry fruits with carpels cultured *in vitro*. Blank bar: The weight of fruits cultured for 19 days. Solid bar: The weight of fruits at the maturing time. All media were supplemented with 10 mg/l of NAAm.

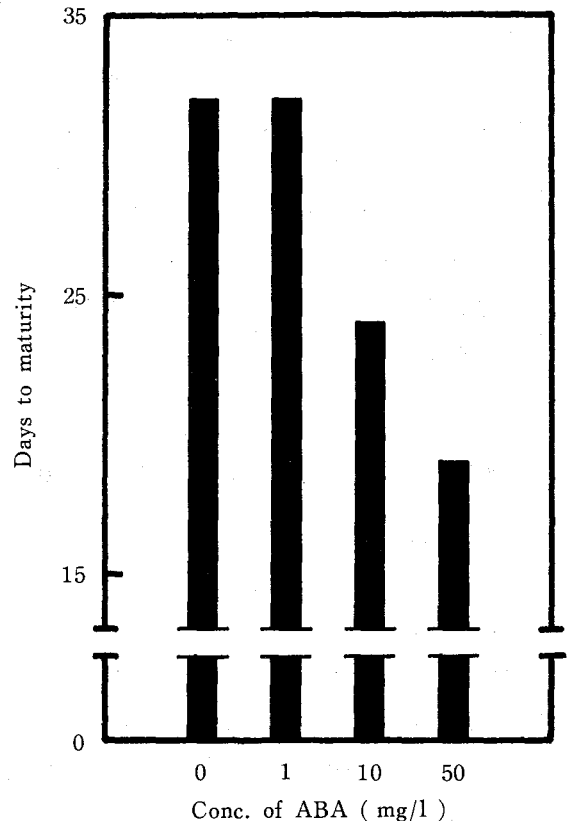


Fig. 27. Effect of ABA on the maturing of strawberry fruits with carpels cultured *in vitro*. Days to maturity: Number of days from explanting to red coloration of the whole surface of the fruits. All media were supplemented with 10 mg/l of NAAm.

果実保蔵 : 白色果を用いた場合はABAの処理濃度により果実が赤く着色するまでの日数は影響をうけなかった。白緑色果を用いた場合には、ABA 0, 100 および 500 mg/l を処理した果実が赤く着色するまでの日数はそれぞれ 10, 8 および 7 であった (第 28 図)。さらに、緑色果を用いた場合には、ABA 100 および 500 mg/l を処理した果実が赤く着色するまでの日数は、それぞれ 9 および 12 であったが、ABA を

処理しなかった果実は実験開始後12日目でもまだ白緑色のままであった(第28図)。このように、ABAによりイチゴ果実の成熟は促進され、さらに処理時の果実の齢が若いほどABAによる成熟促進効果は顕著にあらわれた。以上のことから開花1日前の果実培養および成熟前の果実を用いた果実保蔵のいずれの場合にも、果実に直接ABAを処理すると果実の成熟は促進されることが示唆された。

第4節 果実発育におよぼすABAとBAの相互作用

I. 実験材料および方法

1978年5月に京都大学農学部附属農場で栽培されていたイチゴ苗“宝交早生”より開花1日前の果実を採取した。そして、第1章、第3節の実験方法にしたがい心皮を除去せずに *in vitro* で果実培養を行い、成熟日数(果実を置床後果実が赤く着色するまでの日数)を調査した。基本培地の組成は第1章、第2節の実験材料および方法に記したものと同様なものを用い、処理区としては、BA 0, 0.1 および 1mg/l と ABA 0, 1, 10 および 50mg/l とを組合せた合計12区を設けた。なお、すべての培地にNAAm 10mg/l を添加した。

II. 実験結果

BA無添加区で、ABA濃度が0から50mg/lと高まるに伴ない成熟日数は33から21と少なくなった。逆に、ABA無添加区でBA濃度が0, 0.1 および 1mg/l となると成熟日数は33, 33, 38と多くなった。しかし、BA 0.1 および 1mg/l 区でABA濃度が1, 10, 50mg/lの時の成熟日数は33, 23, 23となり、この日数はBA無添加区でABA濃度が1, 10 および 50mg/lの時の成熟日数とほぼ同じであった(第8表)。このように、ABAを添加しない培地での成熟日数はBA濃度が高くなるにつれ多くなるが、ABAとBAの両方を添加した培地では成熟日数はBA濃度には関係なく、もっぱらABA濃度により支配されていた。

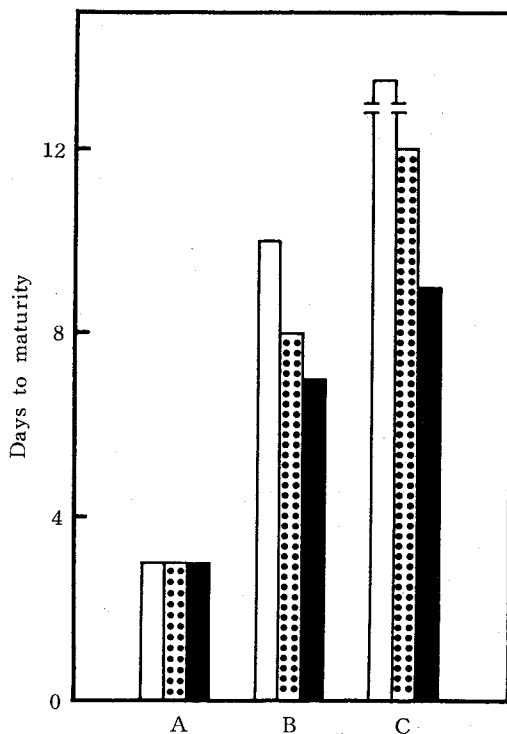


Fig. 28. Effect of ABA on the maturing of strawberry fruits stored in Petri dishes. A: Fruits which colored white, B: Fruits which colored whitish green and C: Fruits which colored green were used for the experiments. Blank bar: Number of days to maturity of fruits placed on filter paper wetted with distilled water. Dotted bar: Number of days to maturity of fruits placed on filter paper wetted with the solution of 100 mg/l of ABA. Solid bar: Number of days to maturity of fruits placed on filter paper wetted with the solution of 500 mg/l of ABA. Days to maturity: Number of days from ex-planting to red coloration of the whole surface of the fruits.

第5節 果実発育および果実中のABA レベルにおよぼすサイトカイニンの影響

I. 実験材料および方法

前節の実験で用いたものと同じイチゴ苗から開花1日前の果実を採取し、第1章、第3節の実験方法にしたがい果実培養を行った。なお、この場合心皮は除去しなかった。基本培地の組成は第1章、第2節の実験材料および方法に記したものと同様なものを用い、NAAm 10 mg/lおよびNAAm 10 mg/lとBA 1 mg/lをそれぞれ添加した培地で培養した。培養27日目に果実を採取し果実発育および果実中のABAレベルを本章、第2節の実験方法にしたがい調べた。

II. 実験結果

果実発育 : 27日間培養した場合、BAを添加しない培地での果実の果色は桃色で、その時の果重は360 mgであったが、BAを添加した培地での果実は白緑色で果重は305 mgであった(第9表)。このように、第1章、第3節で詳述したようにBAを添加した培地で果実を培養

Table 9. Effect of cytokinin on the development of strawberry fruits with carpels cultured *in vitro* for 27 days. All media were supplemented with 10 mg/l of NAAm.

BA (mg/l)	Fruit color	Fruit weight (mg)
0	Pink	360
1	Light green	305

すると果実の肥大および成熟は抑制された。

内生のABAレベル : 27日間培養した場合、BA無添加区の果実ではABAレベルはRf0.7-0.8の部分でかなり高かったが、BA添加区の果実ではABAレベルはごく低かった(第29図)。このように、BAを添加した培地で果実を培養すると果実中のABAレベルは低くなった。

Table 8. Effect of ABA and BA on the maturing of strawberry fruits with carpels cultured *in vitro*. Days to maturity: Number of days from explanting to red coloration of the whole surface of the fruits. All media were supplemented with 10 mg/l of NAAm.

Plant hormones (mg/l)		Days to maturity
ABA	BA	
0	0	33
	0.1	33
	1	38
1	0	33
	0.1	33
	1	33
10	0	23
	0.1	23
	1	23
50	0	21
	0.1	23
	1	23

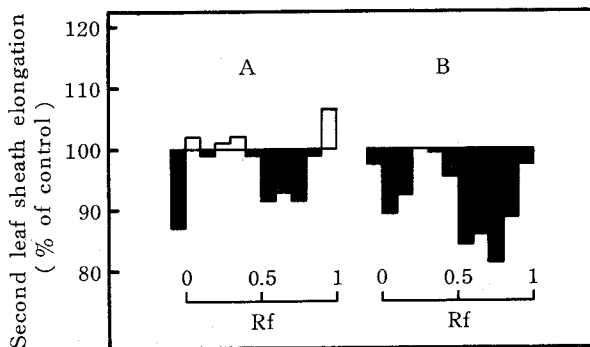


Fig. 29. Effect of BA on ABA level of strawberry fruits with carpels cultured *in vitro* for 27 days. The level of the ethyl acetate layer of an acidified methanol extract representing lg fr.wt. of fruits was bioassayed with rice seedling test following PC with *iso*-propanol: 28% NH_4OH : Water (10 : 1 : 1 V/V) as the solvent. A: Fruits cultured on the medium with 10 mg/l of NAAm and 1 mg/l of BA. B: Fruits cultured on the medium with 10 mg/l of NAAm.

第6節 果実発育および果実中のABAレベルにおよぼす心皮除去の影響

I. 実験材料および方法

本章、第4節で用いたものと同じイチゴ苗から開花1日前の果実を採取し、第1章、第3節の実験方法にしたがい果実培養を行った。この場合心皮を除去した区と除去しない区の2区を設けた。基本培地の組成は第1章、第2節の実験材料および方法に記したものと同様なものを用い、オーキシシンとして NAAm 10 mg/l を添加し、培養17日目に果実をそれぞれ採取した。そして、果実発育と果実中のABAレベルを本章、第2節の実験方法にしたがい調べた。

II. 実験結果

果実発育 : 17日間培養した場合、心皮を除去した果実の果色はすでに桃色になっており果重は550 mgであったが、心皮を除去しなかった果実はまだ白緑色で果重は215 mgであった(第10表)。第1章、第3節で詳述したように、心皮を除去し培養した果実の肥大および成熟は心皮を除去せずに培養した果実に比べ促進された。

Table 10. Effect of carpels on the development of strawberry fruits cultured *in vitro* for 17 days. All media were supplemented with 10 mg/l of NAAm.

	Fruit color	Fruit weight (mg)
Fruit with carpels	Light green	215
Fruit without carpels	Pink	550

内生のABAレベル : 17日間培養した場合、心皮を除去しなかった果実ではABAレベルはあまり高くなかったが、心皮を除去した果実では Rf 0.6-0.8 の部分でABAレベルは高かった(第30図)。このように、心皮を除去し培養した果実中のABAレベルは心皮を除去せずに培養した果実に比べ高くなった。

第7節 果実発育および果実中のABAレベルにおよぼすMHの影響

I. 実験材料および方法

本章、第4節の実験で用いたものと同じイチゴ苗から開花1日前の果実を採取し、第1章、第3節の実験方法にしたがい果実培養を行った。心皮を除去せずに第1章、第2節の実験材料および方法に記したと

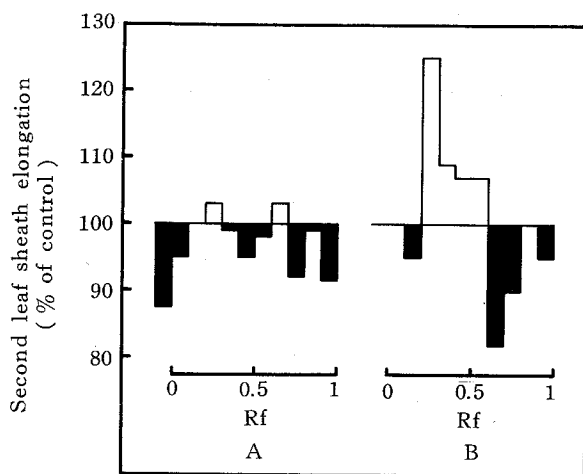


Fig. 30. Effect of the presence of carpels on ABA level of strawberry fruits cultured *in vitro* for 17 days. The level of the ethyl acetate soluble layer of an acidified methanol extract representing lg fr.wt. of fruits was bioassayed with the rice seedling test following PC with *iso*-propanol: 28% NH_4OH : Water (10 : 1 : 1 V/V) as the solvent. Cultivar "Tanginbozu" was used for the bioassay. A: Fruits with carpels. B: Fruits without carpels. All media were supplemented with 10 mg/l of NAAm.

同様の基本培地に NAAm 10 mg/l および NAAm 10 mg/l と MH 50 mg/l をそれぞれ添加した培地で培養し、培養 24 日目に果実を採取し果実発育および果実中の ABA レベルを本章、第 2 節の実験方法にしたがい調べた。

II. 実験結果

果実発育 : 24 日間培養した場合、MH50 mg/l を添加した培地での果実はすでに赤く着色しほぼ成熟しており、その時の果重は 340mg であったが、MH を添加しない培地での果実はまだ白緑色で 270 mg であった (第 11 表)。第 1 章、第 3 節でも詳述したように、MH を添加した培地で培養した果実の肥大および成熟は、MH を添加しない培地で培養した果実のそれらに比べ促進された。

Table 11. Effect of MH on the development of strawberry fruits with carpels cultured *in vitro* for 24 days. All media were supplemented with 10 mg/l of NAAm.

MH (mg/l)	Fruit color	Fruit weight (mg)
0	Light green	270
50	Red	340

内生の ABA レベル : 24 日間培養した場合、MH 無添加区の果実では ABA レベルは低かったが、MH 添加区の果実では Rf 0.7—0.8 の部分で ABA レベルは極めて高かった (第 31 図)。Rf 0.2—0.3 の部分の強い抑制は、標品の MH の溶液をペーパー・クロマトグラフィーした後蛍光検査灯で調べた結果、MH によるものであることがわかった。このように、MH を添加した培地で培養した果実における ABA レベルは MH を添加しない培地で培養した果実に比べ高くなった。

第 8 節 考 察

本章、第 2 節でイチゴ果実中のイネ第 2 葉鞘の伸長を抑制する物質のレベルは、果実が成熟に近づくにつれ増大し、早く成熟する果実では発育早期に抑制物質のレベルが高まることが示された (Kano・Asahira 1981)。そしてその抑制物質はアブサイシン酸 (ABA) であることが明らかにされた (Kano・Asahira 1981)。Rudnicki ら (1968) および、Rudnicki・Pieniazek (1971) は白色で未熟なイチ

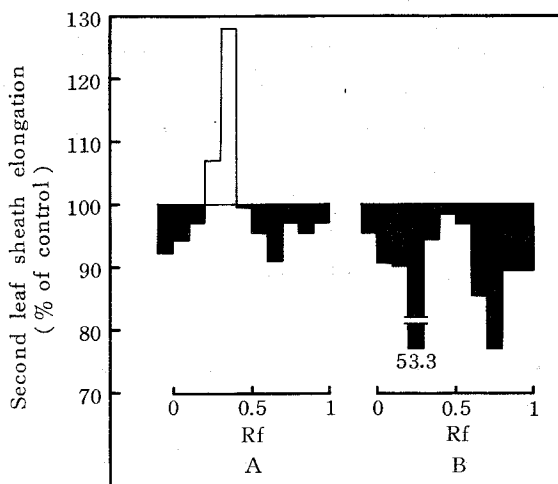


Fig. 31. Effect of MH on ABA level of strawberry fruits with carpels cultured *in vitro* for 24 days. The level of the ethyl acetate soluble layer of an acidified acidified methanol extract representing lg fr. wt. of fruits was bioassayed with rice seedling test following PC with *iso*-propanol: 28% NH_4OH : Water (10 : 1 : 1 V/V) as the solvent. Cultivar "Tanginbozu" was used for the bioassay. A: Fruits cultured on the medium with 10mg/l of NAAm. B: Fruits cultured on the medium with 10mg/l of NAAm and 50mg/l of MH.

ゴ果実よりも赤く着色した成熟果でABA レベルは高いことを報告している。また、他の多くの果実でも果実が成熟するにつれABA のレベルは増大することが明らかにされている(*Solanum lycopersicum* : Dörffling 1970, *Malus pumila* : Rudnicki・Pieniazek 1970, *Gossypium hirsutum* : Davis・Addicott 1972, *Pyrus communis* : Gilら 1972, *Vitis vinifera* : Coombe・Hale 1973, 稲葉1975)。これらより、イチゴ果実でも果実が成熟に近づくと果実中の内生のABA レベルは増大するものと考えられる。さて、サイトカイニンには主に種子で生成されるが、本章、第6節でみたように心皮を除去し果実を培養してもその果実中のABA レベルは増大することより、ABA は果たくでも生成されるものと思われる。本章、第3節でABA を添加した培地で果実を培養すると成熟が早くなることが示された(Kano・Asahira 1981)。Hale・Coombe (1976) もブドウ果実にABA を処理すると成熟が促進されることを、また、Bruinsmaら(1975) はバナナの果皮の着色がABA 処理により早まることを報告している。これらのことよりABA はイチゴ果実の成熟を促進することがわかる。したがって、イチゴ果実では果実の発育が進むにつれ果実の成熟に促進的に作用するABA のレベルが増大するため成熟が促進されるものと考えられる。

さて、第2章で果実の発育後期になると果実発育に抑制的に作用するサイトカイニンのレベルが低下するため成熟が促進されることが示唆された(Kano・Asahira 1979)。このことと本章の実験結果を照合してみると、イチゴ果実では成熟まぢかになると内生サイトカイニンのレベルが低くなると同時に内生ABA のレベルは高くなることがわかる。この事実からイチゴ果実では、1). 発育後期における果実中のABA レベルの増大、あるいは果実中のサイトカイニンレベルの低下が、相助的あるいは別々に果実の成熟を促進する。2). 果実中のサイトカイニンレベルが低下するとABA の生成が活発化するため、果実中のABA レベルが高くなり、その結果成熟が促進される。の2つの考え方が提起される。ところが、本章、第4節でBA とABA の両方を添加した培地でイチゴ果実を培養すると果実の成熟はBA の濃度にはまったく関係なくもっぱらABA の濃度により変化することが示された(Kano・Asahira 1981)。これは、サイトカイニンそれ自身はイチゴ果実の成熟に直接には作用していないことを示していると同時に1) の考え方を否定するものである。一方、本章、第2節で示したように低温下で果実が発育した場合、あるいは本章、第5節で示したようにBA を添加した培地で果実を培養した場合のように果実中のサイトカイニンレベルを高めるような条件下では成熟は抑制され果実中の内生ABA のレベルは低くなった。逆に本章、第6節で示したように心皮を除去し培養した場合、あるいは本章、第7節で示したようにMH を添加した培地で培養した場合のように、果実中のサイトカイニンレベルを低めるような条件下では成熟は促進され、果実中の内生のABA レベルは高くなった。このように、果実中のABA レベルは果実中のサイトカイニンレベルにより影響をうけた。Bruinsmaら(1975) はバナナ果皮の着色はBA により抑制され、ABA により促進されることを示し、この結果からサイトカイニンはABA の生成を阻害していることを示唆した。以上より、イチゴ果実中에서도ABA の生成がサイトカイニンにより制御されていることが推察される。したがって、イチゴ果実の成熟に対しては2) の考え方にたつのが正しいものと考えられる。

結局、イチゴ果実の発育、特に成熟については次のように考えることができる。果実の発育後期になるとサイトカイニンレベルが低下するためサイトカイニンによるABA 生成の抑制圧が小さくなる。その結果、ABA の生成が活発になり果実中のABA レベルが高くなる。そして、このABA レベルが高くなる

ことが果実の成熟を促進する。

第9節 摘 要

イチゴ果実の発育におけるアブサイシン酸(ABA)の役割について調べると同時に果実発育に対するサイトカイニンとABAの相互作用についても実験を試みた。

1. 20℃で発育した果実は、30℃で発育した果実に比べ肥大および成熟は抑制された。20℃区の果実では開花20日目まではイネ第2葉鞘の伸長を抑制する物質の活性はまったく認められなかったが、その物質のレベルは赤く着色しはじめた25日目では低く、26日目になるとかなり高くなり、成熟時の28日目には極めて高くなった。30℃区の果実では、その抑制物質のレベルは開花15日目にすでにかなり高く、成熟した開花20日目までそのレベルは増大し続けた。

2. イチゴ果実が成熟するにつれ果実中でそのレベルが増大する抑制物質はABAであった。

3. 開花1日前の果実をABAとナフトレンアセトアミド(NAAm)とを添加した培地で心皮を除去せずに培養した場合、および成熟前の果実をシャーレ内でABA溶液をしみこませたろ紙上で保蔵したいずれの場合でも、果実の成熟はABA処理により促進された。また、処理したABAの濃度が高まるにつれ果実の成熟の促進程度は強くなった。

4. NAAmを添加した基本培地にABAとN⁶-ベンジルアデニン(BA)をとともに加えた培地で開花1日前の果実を心皮を除去せずに培養した場合、果実の成熟はBAの濃度にはまったく関係なくABAの濃度の増加とともに早くなった。

5. NAAmを添加した基本培地にBAを加えた培地で開花1日前の果実を心皮を除去せずに培養した場合、果実の肥大および成熟はBAを添加しないNAAmのみの培地で培養した果実に比べ抑制された。培養27日目ではBA添加区の果実中の内生のABAレベルはBA無添加区のそれに比べ低かった。

6. NAAmを添加した培地で開花1日前の果実を心皮を除去し培養した場合、果実の肥大および成熟は心皮を除去せずに培養した果実に比べ促進された。培養17日目での、心皮を除去した果実では、心皮を除去しなかった果実に比べABAレベルは高かった。

7. NAAmを添加した基本培地にマレイン酸ヒドラジド(MH)を加えた培地で開花1日前の果実を心皮を除去せずに培養した場合、果実の肥大および成熟はMHを添加しないNAAmのみの培地で培養した果実に比べ促進された。培養24日目での、MH添加区の果実ではMH無添加区の果実に比べABAレベルは高かった。

8. 以上より、イチゴ果実の成熟におけるABAの役割は次のように考えることができる。イチゴ果実では果実発育の後期になると果実中のサイトカイニンレベルが低下するためサイトカイニンによるABA生成の抑制作用が弱くなる。したがって、果実中のABA生成が活発化しABAレベルが高くなり、その結果果実の成熟は促進される。なお、ABAは果たく中でも生成されるものと考えられる。

第4章 イチゴ果実の発育におけるエチレンの役割

第1節 緒 言

第3章でイチゴ果実が成熟に近づくとき果実中のABAレベルが高まること、および果実にABAを処理すると成熟が早まることから、イチゴ果実の成熟はABAにより支配されていることが示唆された (Kano・Asahira 1981)。他方、多くの果実でエチレンが成熟に決定的な役割を果たしていることが報告されている (*Citrus limon*: Biale・Young 1962, *Persea americana*, *Musa sapientum*, *Cucumis melo*, *Citrus limon*, *Mangifera indica*, *Lycopersicon esculentum*: Burg・Burg 1965, *Ficus carica*: Hiraiら 1967, Maxie・Crane 1968)。ところが、イチゴ果実の成熟とエチレンとの関係を調べた報告は2, 3 (岩田 1970, 田辺ら 1972) があるが、成熟におけるエチレンの役割について明確に論じられていない。そこで、エチレンがイチゴ果実の成熟にどのような関連性をもっているかを考察するため、はじめに果実発育に伴うエチレン発生を、つぎに温度、サイトカイニンおよびABAなどの果実発育を制御している諸要因が果実からのエチレン発生におよぼす影響について調べた。

第2節 果実発育に伴う果実からのエチレン発生量の消長

I. 実験材料および方法

第3章、第2節で用いたものと同じイチゴ苗から、20℃で発育した果実の場合は開花10, 15, 20, 25, 26および28日目に、30℃で発育した果実の場合は開花15, 18および20日目に約10gの果実をそれぞれ採取し、Youngら (1952) の方法を修正した第32図に示したような方法で20℃, 全日長、

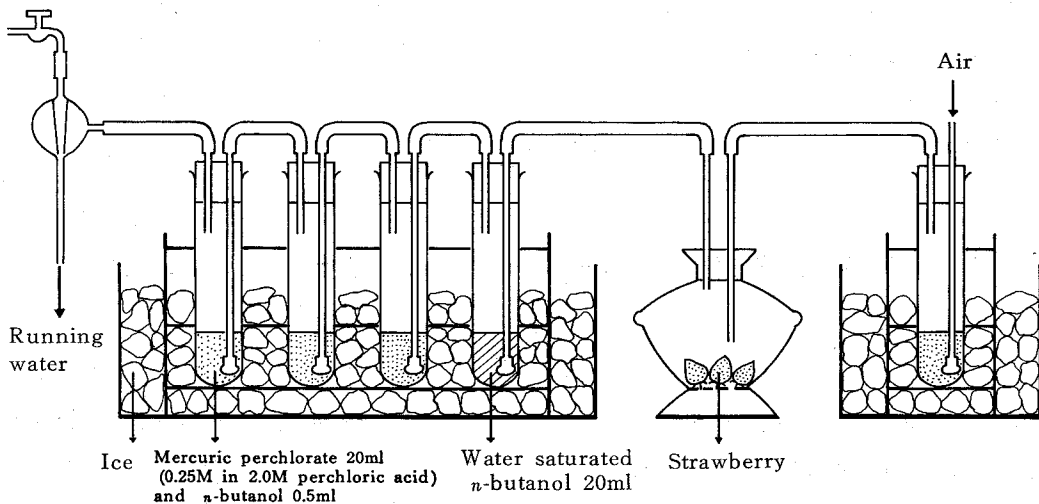


Fig. 32. Apparatus for absorption method of ethylene evolved from strawberry fruits.

照度 1500 ルックス（白色蛍光灯）の条件下で 12 時間保蔵し、その間果実から発生するエチレンを捕集し続けた。捕集終了後、エチレンが吸着された過塩素酸水銀を集めた合計 60 ml を測定する時まで 4℃下で貯蔵した。測定時には過塩素酸水銀の合計 60 ml より 5 ml を容量が約 10 ml の試験管に分取し、ゴム栓をした後注射器で 4 規定の塩化リチウム 1 ml を試験管内に注入した。この試験管をよく振とうし 5 分間静置後、ヘッドスペースよりシリンジで気体 1 ml を分取しガス・クロマトグラフィー（島津ガスクロマトグラフ・Column temperature : 80℃, Packing : Porapak Q, Carrier gas : He, Inlet pressure : 0.6 kg/cm², H₂ flow rate : 1 kg/cm², Air flow rate : 1 kg/cm², Detector : FID）を行った。

II. 実験結果

20℃および 30℃における果実発育については、第 3 章、第 2 節の実験結果で詳細に述べた。

果実発育に伴うイチゴ果実からのエチレン発生量の消長 : 20℃で発育した果実の場合、開花 10 日目の緑色果ではエチレン発生量はごく少ないが、果実が急激に肥大し緑色が退色し始めた 15 日目ごろには発生量は 1200 mg/kg/day とかなり多くなった。そして、その後の発生量は一時減少するが、果実が赤く着色し始めた 25 日目になると 5800 mg/kg/day と極めて多くなり、成熟に達した 28 日目には激減した（第 33 図）。一方、30℃で発育した果実からのエチレン発生量は開花 15 日目では 4285 mg/kg/day であった。そして、その発生量は開花 18 日目になると 5750 mg/kg/day と最高となり成熟した開花 20 日目では極めて少なくなった（第 33 図）。このように、30℃で発育した果実は 20℃の果実に比べ発育早期にエチレン発生量のピークが現われることが認められた。

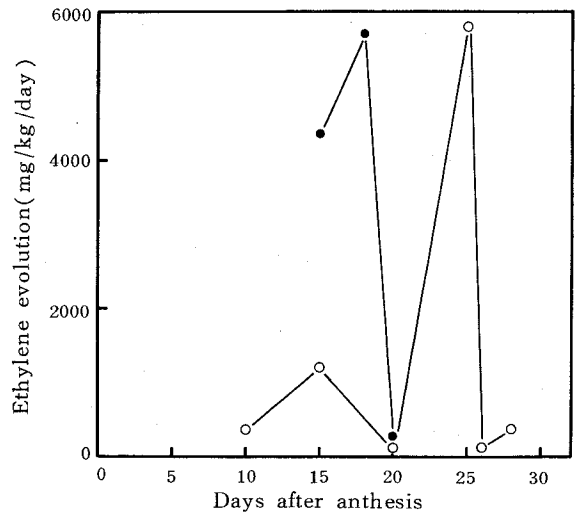


Fig. 33. Effect of temperature on ethylene evolution in strawberry fruits. Blank circle: Fruits grown at 20°C. Solid circle: Fruits grown at 30°C.

第 3 節 果実発育および果実からのエチレン発生におよぼすサイトカイニンの影響

I. 実験材料および方法

第 3 章、第 2 節の実験で用いたものと同じイチゴ苗から開花 1 日前の果実を採取し、第 1 章、第 3 節の実験方法にしたがい心皮を除去せずに第 1 章、第 2 節の実験材料および方法を記したものと同様の組成の基本培地で果実の培養を行った。すなわち、NAAm 10 mg/l のみを添加した培地で 15、20、25、30 および 35 日間培養した果実ならびに NAAm 10 mg/l と BA 1 mg/l とを添加した培地で 15、

20, 25, 30, 35 および 40 日間培養した果実について果実発育を調べると同時に果実約 2.5 g づつ採取し、本章、第 2 節の実験方法にしたがい 20℃、全日長、照度 1500 ルックス（白色蛍光灯）の条件下で 24 時間保蔵した果実から発生するエチレンを捕集し測定を行った。

II. 実験結果

果実発育 : NAA 10 mg/l のみを添加した培地で培養した果実の場合、培養 15 日目から 25 日目までは果実は徐々に肥大したが果実が白緑色になった 25 日目から果実はかなり急速に肥大した。そして 30 日目には赤く着色し始め、その 5 日後には果実全体が赤く着色し成熟に至りその時の果重は 550 mg であった（第 34 図）。一方、BA を添加した培地で培養した果実は培養 15 日目より成熟するまでほぼ直線的に肥大した。果実は培養 30 日目までは緑色であったが、35 日目になると果実表面のほぼ半分が赤く着色し始め、40 日目には成熟し、その時の果重は 430 mg であった（第 34 図）。

果実からのエチレン発生量の消長 : BA 無添加区の果実の場合、培養 15 日目ではエチレン発生量は 3460 mg/kg/day と極めて多かったが、次第に減少し 30 日目には最低となった。その後発生量は徐々に増大し成熟した 35 日目には 1180 mg/kg/day となった（第 35 図）。一方、BA 添加区の果実の場合、エチレン発生量の消長パターンは BA 無添加区の場合と同じであった。すなわち、培養 15 日目に高く徐々に減少し成熟する 5 日前の培養 35 日目に最低となった。その後成熟に伴い増大し成熟時には 1318 mg/kg/day となった。BA 無添加区の果実から

のエチレン発生量が最低となるのは培養 30 日目であったが、BA 添加区の果実の場合のそれは 5 日おくれた培養 35 日目であった（第 35 図）。このように、*in vitro* で培養した果実からの果実発育に伴うエチレン発生量の消長パターンは、普通に栽培され得られた果実からの発育に伴うエチレン発生量のパターンとはまったく異っていた。しかし、いずれの場合もイチゴ果実が成熟する時期にはエチレン発生量は多くなった。

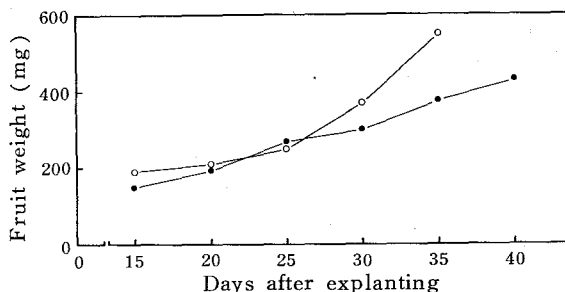


Fig. 34. Effect of cytokinin on the growth of strawberry fruits with carpels cultured *in vitro*. Blank circle: Fruits cultured on the medium with 10 mg/l of NAA. Solid circle: Fruits cultured on the medium with 10 mg/l of NAA and 1 mg/l of BA.

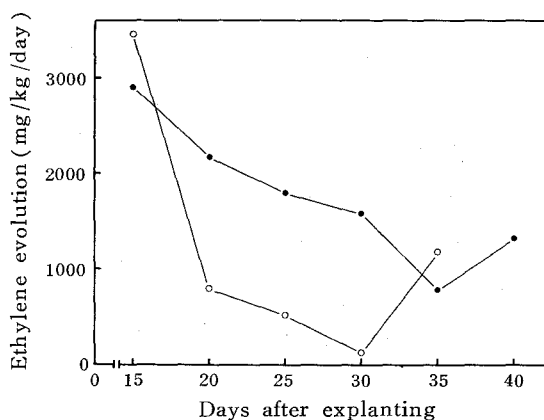


Fig. 35. Effect of cytokinin on ethylene evolution in strawberry fruits with carpels cultured *in vitro*. Blank circle: Fruits cultured on the medium with 10 mg/l of NAA. Solid circle: Fruits cultured on the medium with 10 mg/l of NAA and 1 mg/l of BA.

第4節 果実発育および果実からのエチレン発生量におよぼす ABA の影響

I. 実験材料および方法

第3章、第2節の実験で用いたものと同じイチゴ苗から白緑色の果実を採取し、第3章、第3節の実験方法に記述したように果実をシャーレ内に保蔵してABA処理を行った。そして、ABA0 および 500 mg/l 処理後 0, 3 および 5 日目に果実約 25 g を分取し果実から発生するエチレンを本章、第2節の実験方法にしたがい測定した。

II. 実験結果

果実の着色 : ABAを処理しなかった果実は実験開始後3日目ではまだ白緑色であったが、5日目になるとようやく緑色が退色し白色になった。一方、ABAを処理した果実は処理後3日目にすでに着色が始まり、5日目には果実表面が桃色になった。このように、ABAを処理するとイチゴ果実の成熟が促進された。

果実からのエチレン発生量 : 実験開始後0, 3日目ではABA無処理区およびABA処理区のいずれの果実からもエチレンの発生はほとんど認められなかった。しかし、5日目になるとABA処理区の果実からのエチレン発生量は 257 mg/kg/day であったが無処理区の果実からのそれは 148 mg/kg/day であった (第36図)。このように、イチゴ果実にABAを処理すると果実発育の早期にエチレン発生量が多くなった。

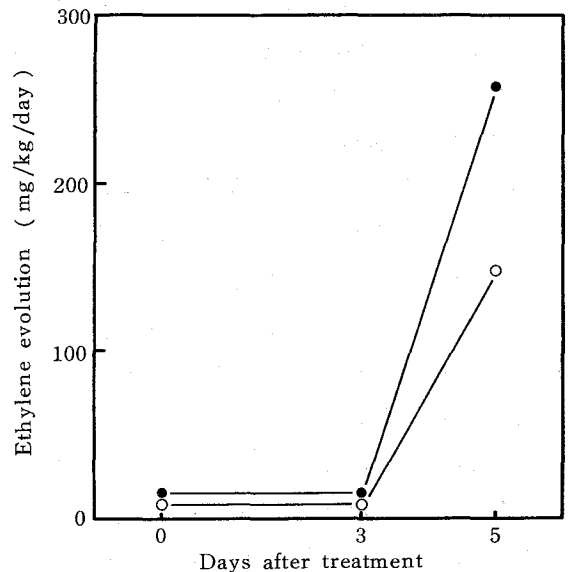


Fig. 36. Effect of ABA on ethylene evolution in strawberry fruits. Blank circle: Fruits placed on filter paper wetted with distilled water. Solid circle: Fruits placed on filter paper wetted with the solution of 500mg/l of ABA.

第5節 果実発育におよぼすエチレンの影響

I. 実験材料および方法

第3章、第4節の実験で用いたものと同じイチゴ苗より白緑色および白色の果実を採取し水道水で洗浄した。そして約 4.5 l のガラス容器に採取した果実をそれぞれ 20 個を静置した後、シリンジでガラス容器内のエチレン濃度が 0, 100 および 1000 mg/l になるようにエチレンガスを注入した。そして、そのガラス容器を 25 °C, 全日長, 照度 3000 ルックス (白色蛍光灯) の条件下に静置し果実の着色について調べた。

II. 実験結果

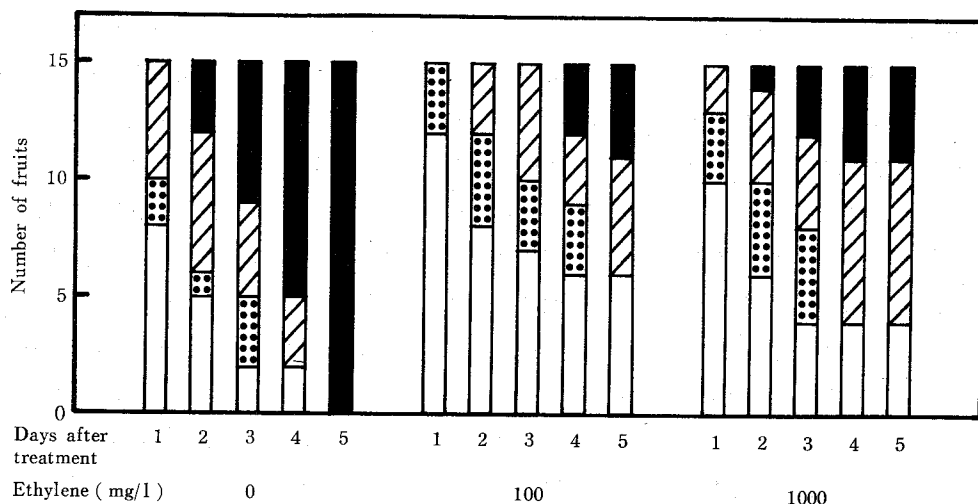


Fig. 37. Effect of ethylene on the maturing of strawberry fruits. Fruits whose color was whitish green were used for this experiment. Blank bar: Number of fruits whose color remained whitish green. Dotted bar: Number of fruits which began to redden. Striped bar: Number of fruits which nearly matured. Solid bar: Number of fruits which completely matured.

白緑色の果実を用いた場合、実験開始後5日目での赤く着色し完熟した果実の全体で占める割合は、無処理区で100%，100mg/l および1000 mg/l 処理区では30%以下であった（第37図）。一方、白色の果実を用いた場合、3日目での赤く着色し完熟した果実の全体で占める割合は、無処理区で60%，100mg/l および1000mg/l 処理区ではほぼ70%であった（第38図）。このように、白色果ではエチレンによる成熟促進の効果はまったく認められなかったし、白緑色果ではむしろ成熟は抑制された。

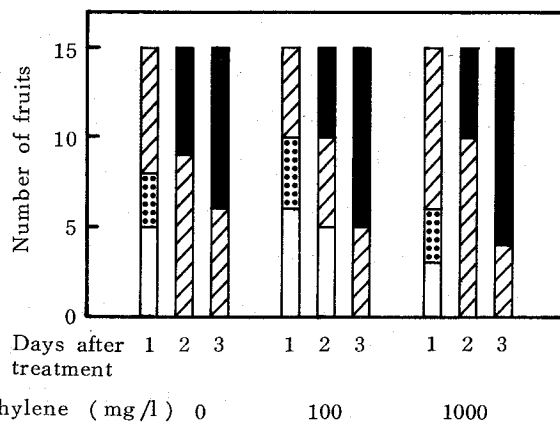


Fig. 38. Effect of ethylene on the maturing of strawberry fruits. Fruits whose color was white were used for this experiment. Blank bar: Number of fruits whose color remained white. Dotted bar: Number of fruits whose color began to redden. Striped bar: Number of fruits which nearly matured. Solid bar: Number of fruits which completely matured.

第6節 考 察

第3章で成熟前の果実中のABAレベルの増大、およびABA処理による成熟促進から、イチゴ果実の成熟はABAにより制御されていることが指摘された（Kano・Asahira 1981）。ところが、エチレンが果実

の成熟に重要な役割を果たしていることが多く報告されている。そこで、イチゴ果実の成熟におけるエチレンの役割について調べ、その結果について以下の考察を行った。

本章、第2節で20℃および30℃のいずれで发育したイチゴ果実でもエチレン発生量は成熟直前に極めて多くなることが明らかになった。また、*in vitro*培養したイチゴ果実の場合も果実が赤く着色し始めるころに一時エチレン発生量は低下するものの、その後成熟するにつれ増大した(加納・浅平1979)。岩田(1970)および田辺ら(1972)は赤く着色し始めたイチゴの果実組織内にはかなり高濃度のエチレンが存在することを報告している。これらのことからみて、イチゴ果実では果実が成熟する直前に多量のエチレンが生成されているものと思われる。一方、第3章で明らかにされた成熟に伴うイチゴ果実中のABAレベルの消長と本章での成熟に伴うエチレン発生量の変化とを総合してみると、ABAレベルの増大する時期とエチレン発生量の増大する時期とがほぼ一致する。他方、植物組織からのエチレン発生量はABA処理により促進されること(Cooperら1968, Craker・Abeles1969)が報告されている。これらのことを考え合せると、イチゴ果実の場合成熟に伴い果実中のABAレベルが増大し、そのため果実からのエチレン発生量が多くなり成熟が促進されることが推察される。そこで、果実中のABAレベルを高めるようにイチゴ果実をより高温下で发育させたり、あるいは果実にABAを処理したところ、果実からのエチレン発生量は发育早期に多くなり成熟は促進された。逆に、果実中のABAレベルを低下させるように果実にサイトカイニンを処理するとエチレン発生量のピークは遅れ果実の成熟は抑制された。したがって、イチゴ果実の发育後期になり果実中のABAレベルが高くなるとエチレンが多量に発生し、成熟が促進されるものと考えられる。一方、多くの果実で成熟する前に多量のエチレン発生があること、およびエチレンにより成熟が促進されることが報告されている(*Citrus limon*, *Malus pumila*, *Musa sapientum*: Biale・Young1962, *Cucumis melo*: Patt・Goeschl1968)。したがって、イチゴ果実においてもエチレンにより成熟が促進されることが推察される。そこで、イチゴ果実にエチレンを直接処理したところ、成熟はまったく影響されないばかりでなく抑制される場合もあった(加納・浅平1979)。黒江ら(1971)もエチレン発生剤であるエスレルを栽培中のイチゴ果実に処理しても成熟は促進されなかったことを、さらに岩田(1970)もイチゴ果実の成熟はエチレン処理により影響されなかったことを指摘している。このような事実より、イチゴ果実の場合、果実に外部よりエチレンを処理しても成熟は促進されないものと考えられる。そこで、その理由として、1). エチレンは果実の成熟の結果として発生したものである。2). 果実組織が外生エチレンに反応する生理的状态に達した時にはすでにその組織の中に成熟を促進するのに十分な内生エチレンが存在している。の2つをあげることができる。

さて、1)の見解にたった場合、最終的に成熟を制御する物質はABAであると考えられる。一方、2)の見解の場合、最終的に成熟に作用する物質はエチレンと考えられる。すなわちABAにより成熟が促進されるのは、ABAが早期に果実組織を内生エチレンに反応できるような生理的状态にする役割を持つからであると考えられる。1).あるいは2).のいずれの考え方にしても果実の成熟に重要な役割を果たしている物質はABAと考えられる。

第7節 摘 要

イチゴ果実の発育におけるエチレンの役割を解析するため、果実の発育に伴うエチレン発生量の消長および成熟に影響する温度および植物ホルモンなどの諸要因とエチレン発生量の関係について調べた。

1. 20℃で発育したイチゴの果実発育に伴うエチレン発生量は、果実が急速に肥大し始める開花15日目に少し多くなりその後減少するが、果実が赤く着色し始める開花25日目に5800mg/kg/dayと極めて多くなった。一方、30℃で発育した果実は20℃区の果実に比べ成熟は促進され、7日早い開花18日目にエチレン発生量は4285mg/kg/dayと最も多くなった。

2. *in vitro*で開花1日前の果実を心皮を除去せずに培養した場合、果実からのエチレン発生量の消長パターンは、20℃あるいは30℃で栽培し発育したintactのイチゴ果実の場合とはまったく異なっていた。すなわち、NAAmのみを添加した培地で培養した場合、エチレン発生量は培養15日目に最も高くその後徐々に減少した。そして、果実が赤く着色し始める30日目には最低となり、成熟するにつれ増大した。しかし、NAAmとBAを共に添加した培地で培養した果実ではBA無添加区の果実に比べ成熟は抑制された。そして、エチレン発生量の消長パターンはBA無添加区の果実の場合と同じであったが、発生量が最低となる時期が遅れたので、その後の成熟に伴う発生量の増大も遅れた。

3. 成熟前の果実をシャーレ内でABA溶液をしみ込ませたろ紙上で保蔵した果実の成熟は、蒸留水のみをしみ込ませたろ紙上で保蔵した果実に比べ促進された。ABA処理区の果実からのエチレン発生量はABA無処理区の果実に比べ多かった。

4. 密閉したガラス容器の中に成熟前のイチゴ果実をいれた後、エチレンガスを注入しインキュベートした。白緑色の果実を用いた場合には、エチレンは成熟に対して抑制的に作用した。白色の果実の場合にはエチレンは成熟に影響をおよぼさなかった。

5. 以上の結果から、1). エチレンはイチゴ果実が成熟した結果発生したものである。2). イチゴ果実の組織が外生エチレンに反応する生理的状态に達した時にはすでにその組織の中に成熟を促進するのに十分な内生エチレンが存在している。との2つの推論がなされた。

第5章 総 括

イチゴ果実の生産においては、果実収穫の労力の合理化ならびに果実の品質保持などは解決すべき大きな問題であるが、これらは果実の発育および成熟に密接に関連する問題である。本論文では果実発育ならびに成熟の内的要因としての植物ホルモンの役割を研究し果実発育および成熟の化学的調節の基礎を明らかにしようとしたものである。

1. イチゴ果実の組織中のサイトカイニンレベルおよび種子の働きを推察するため、開花後種々の日数を経過した果実の組織を *in vitro* で培養した。開花後の日数が経過するに伴い、また同じ開花日の果実組織でも種子を除去するかしないかで、その培養組織から形成されてくるカルスの量および性状が異なった。この結果と培養組織から形成されてくるカルスの量および性状は培地のオーキシン・サイトカイニンの濃度比により決まるという報告とを照らし合わせてみると、イチゴ果実の組織中では果実発育中期にサイトカイニンレベルが高くなること、および種子でそのレベルが高いことが推測された。

2. イチゴ果実の発育における心皮および植物ホルモンの役割を明確にすることを目的として、開花1日前の果実の器官培養を行った。オーキシンを添加した培地で培養した場合、果実は正常に肥大したが、ジベレリンを添加した培地では果実基部のみが異常に肥大し、果実上部はまったく肥大しなかった。しかし、オーキシンと共存する場合にはジベレリンは果実の肥大および成熟に促進的に作用した。ところが、合成サイトカイニンの一種である N^6 -ベンジルアデニン (BA) を添加した培地では果実の肥大および成熟は抑制された。一方、心皮を除去し培養した果実の肥大および成熟は心皮を除去しなかった果実に比べ促進された。また、心皮を機械的に除去する代りに細胞分裂を阻害するマレイン酸ヒドラジド (MH) を添加した培地で培養すると、心皮は死滅し果実の肥大および成熟は促進された。

以上より、イチゴ果実の発育促進にはジベレリンよりオーキシンが重要な役割をもち、さらに、心皮で生成されるサイトカイニンが果実発育に抑制的に作用しており、この両ホルモンの量比の変化のもとで果実の正常な発育が進行するものと考えられる。

なお、1と2より、イチゴ果実の発育に抑制的に作用するサイトカイニンは種子に多く含まれ、果実中におけるそのレベルは発育中期に高くなることが示唆された。

3. イチゴ植物体上で発育した果実からサイトカイニンの抽出を試み、イチゴ果実の発育におけるサイトカイニンの役割を明確にしようとした。イチゴ果実中にはゼアチンおよびそのヌクレオチドおよびリボシドと、今まで報告されてきたサイトカイニンとは化学構造を異にすると推察される細胞分裂促進物質が含まれていた。なお、発育中期の種子内部は胚乳で満たされており、未熟な状態であったが、成熟近くになると胚で占められほぼ完熟の状態となった。また、低温下で果実発育は高温下よりも遅れ、種子は遅くまで未熟な状態であった。そして、そのような果実中のサイトカイニンレベルは発育後期まで高かった。なお、MHを添加した培地で果実培養を行い、種子内組織を死滅させると果実発育は促進され果実中のサイトカイニンレベルも低下した。

以上のことから、低温下で発育した果実のように種子の発育が遅く発育後期まで未熟な状態にある場合は種子がおそくまで活発にサイトカイニンを生産するため、果実中のサイトカイニンレベルは長く高く保たれるため、果実発育は抑制されるものと考えられる。一方、これとは逆に高温下で果実が発育した場合は種子の発育が早く進行して発育を完了するため、サイトカイニンレベルが早く低下し、果実発育は促進されるものと考えられる。

4. イチゴ果実の発育におけるアブサイシン酸 (ABA) の役割と果実発育におけるABAとサイトカイニンの相互作用について検討した。植物体上で発育中の果実の抽出物中には、果実が成熟に近づくに伴いイネ第2葉鞘の伸長を抑制する物質のレベルが増大したが、その物質はABAであることが明らかになった。成熟の早い果実では成熟の遅い果実に比べ発育早期にABAが現れ始め、より早期にそのレベルが高まった。この結果は果実中のABAレベルが高まると成熟が促進されることを示しているものと考えられる。一方、ABAを添加した培地で果実培養を行ったところ、果実の成熟は促進された。したがって、果実が発育し発育後期になると果実中のABAレベルが高くなるため、イチゴ果実の成熟はすすむものと考えられる。しかし、前項では果実の発育後期になり果実中のサイトカイニンレベルが低下するため、イチゴ果実の成熟はすすむことが指摘された。このことを考え合わせると、イチゴ果実の成熟は、1). 果実中のサイトカイニンレベルの低下、ならびにABAレベルの増大により、2). 果実中のサイトカイニンレベルが低下するとABA生成が高まり、果実中のABAレベルが増大するため、進行するという2つの考え方が可能である。そこで、ABAとBAを共に添加した培地で果実培養を行ったところ、果実の成熟はBA濃度にはまったく関係なく、もっぱら、ABA濃度に影響された。この結果は1).の考え方を否定するものである。一方、果実中のサイトカイニンレベルを高める手段として、低温下で果実を発育させたり、サイトカイニンを添加した培地で果実培養を行ったところ、果実中のABAレベルは低下し果実の成熟は抑制された。これとは逆に、果実中のサイトカイニンのレベルを低める手段として、心皮を除去した果実を培養したり、MHを添加した培地で果実培養を行ったところ、果実中のABAレベルは高まり果実の成熟は促進された。この結果は2).の考え方を支持するものである。

したがって、イチゴ果実の成熟については次のように考えることができる。果実の発育後期になると果実中のサイトカイニンレベルが低下するため、サイトカイニンによるABA生成の抑制圧が弱くなる。したがって、果実中のABA生成が活発化し果実中のABAレベルが高くなり成熟は促進される。

5. イチゴ果実の発育におけるエチレンの役割を明確にするため、果実から発生する内生エチレンの測定と果実へのエチレン処理を試みた。他の多くの果実と同じようにイチゴ果実の場合も成熟近くになると果実からのエチレン発生のピークが認められた。さらに、普通に栽培し得られた果実でも、*in vitro*で培養した果実のいずれの場合でも成熟の早い果実では成熟の遅い果実より発育早期にエチレン発生の増大が認められた。これらの結果はエチレンがイチゴ果実の成熟を促進していることを示唆しているものと考えられる。ところが外部よりエチレンを果実に処理しても成熟は促進されなかった。この理由として、1). エチレンは果実の成熟の結果発生したものである。2). 外部よりエチレンを処理した時にはすでに成熟の進行に十分な内生エチレンが果実組織内に存在する。の2つが考えられる。

1).の考え方ではイチゴ果実の発育を最終的に制御している物質はABAであると考えられる。しかし、

2).の考え方にたった場合、ABAの役割はイチゴ果実の組織をより早期に組織中のエチレンに反応するような生理的状态にさせることにあり、最終的に成熟を促進する物質はエチレンであると考えられる。1). , 2).のいずれの考え方にしても、イチゴ果実の発育に対しABAは重要な役割を果していると思われる。

以上みてきたように、イチゴ果実の発育に対し、根本的には種子が重要な役割を果しているが、種子発育に伴うサイトカイニンレベルの消長、そしてその結果として生ずるABAレベルの変化によって果実の後期の発育、特に成熟が調節されていることが明確にされた。このことは、イチゴ果実の生産における果実収穫の労力の合理化、および収穫後の果実の品質保持の問題の解決に役立つものと考えられる。

引用文献

1. Asahira, T., Y. Takeda., T. Nishio., M. Hirabayashi and Y. Tsukamoto. 1967. Studies on fruit development in tomato. I. Ovule development and content of diffusible auxin in synthetic auxin- and gibberellin-induced parthenocarpic tomato fruits in relation to their development. Mem. Res. Inst. Food Sci., Kyoto Univ. No. 28: 47-74.
2. Asahira, T., H. Takagi., Y. Takeda and Y. Tsukamoto. 1968. Studies on fruit development in tomato. II. Cytokinin activity in extracts from pollinated, auxin- and gibberellin-induced parthenocarpic tomato fruits and its effect on the histology of the fruit. Mem. Res. Inst. Food Sci., Kyoto Univ. No. 29: 24-54.
3. 浅平 端, 加納恭卓, 1977. イチゴの果実組織の培養における葉条形成. 園学雑. 46: 317-324.
4. Bajaj, Y. P. S and W. B. Collins. 1968. Some factors affecting the in vitro development of strawberry fruits. Proc. Amer. Soc. Hort. Sci. 93: 326-333.
5. Biale, J. B. and R. E. Young. 1962. The biochemistry of fruit maturation. Endeavour. 21: 164-174.
6. Blumenfeld, A. and S. Gazit. 1970. Cytokinin activity in avocado seeds during fruit development. Plant Physiol. 46: 331-333.
7. Bruinsma, J., E. Knecht and A. Varga. 1975. The role of growth-regulating substances in fruit ripening. C. N. R. S. No. 238: 193-199.
8. Burg, S. P. and E. A. Burg. 1965. Ethylene action and the ripening of fruits. Science. 148: 1190-1196.
9. Coombe, B. G. and C. R. Hale. 1973. The hormone content of ripening grape berries and the effects of growth substance treatments. Plant Physiol. 51: 629-634.
10. Cooper, W. C., G. K. Rasmussen., B. J. Rogers., R. C. Reece and W. H. Henry. 1968. Control of abscission in agricultural crops and its physiological basis. Plant Physiol. 43: 1560-1576.
11. Craker, L. E. and F. B. Abeles. 1969. Abscission: Role of abscisic acid. Plant Physiol. 44: 1144-1149.
12. Crane, J. C. and M. M. Nelson. 1970. Apricot fruit growth and abscission as affected by maleic hydrazide-induced seed abortion. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 95: 302-306.
13. Creasy, M. T. and N. F. Sommer. 1964. Growth of *Fragaria vesca* L. receptacles in vitro with reference to gibberellin inhibition by unfertilized carpels. Physiol. Plant. 17: 710-716.
14. Davis, L. A. and F. T. Addicott. 1972. Absciscic acid: Correlations with abscissin and with development in the cotton fruit. Plant. Physiol. 49: 644-648.

15. Dörffling, K. 1970. Quantitative Veränderungen des Abscisisäuregehaltes während der Fruchtentwicklung von *Solanum lycopersicum* L. *Planta*. 93: 233–242.
16. Eliasson, L. 1969. Growth regulators in *Populus tremula*. I. Distribution of auxin and growth inhibitors. *Physiol. Plant.* 22: 1288–1301.
17. Gardner, F. E. and P. C. Marth. 1937. Parthenocarpic fruits induced by spraying with growth promoting compounds. *Bot. Gaz.* 99: 184–195.
18. Gautheret, R. J. 1959. *La culture des tissus végétaux*. Masson, Paris.
19. Gil, G. F., Martin, G. C. and W. H. Griggs. 1972. Fruit set and development in the pear: Extractable endogenous hormones in parthenocarpic and seeded fruits. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 97: 731–735.
20. Gupta, G. R. P. and S. C. Maheshwari. 1970. Cytokinins in seeds of pumpkin. *Plant Physiol.* 45: 14–18.
21. Gustafson, F. G. 1936. Inducement of fruit development by growth promoting chemicals. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 22: 628–636.
22. Hale, C. R. and B. G. Coombe. 1976. In “The development of fleshy fruits.” *Ann. Rev. Plant Physiol.* 27: 507–528.
23. 平井重三, 平田尚美, 堀内昭作. 1967. 油処理によるイチジク果実の成熟促進に関する研究(第2報) 油処理した果実の物質代謝. *園学雑.* 36. 36–44.
24. Hunter, A. W. S. 1941. The experimental induction of parthenocarpic strawberries. *Can. J. Res.* 19: 413–419.
25. 岩田 隆. 1970. 収穫果実の呼吸型についての園芸利用学的研究. 京都大学学位論文.
26. 稲葉昭次. 1975. デラウェアブドウ果実の成熟に関する生理学的研究——とくに植物ホルモンの関係について. 京都大学学位論文.
27. Kano, Y. and T. Asahira. 1978. Effects of some plant growth regulators on the development of strawberry fruits *in vitro* culture. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 47: 195–202.
28. 加納恭卓, 浅平 端. 1979. イチゴ果実の発育に関する研究. (第5報). 成熟におよぼすエチレンの影響. *園芸学会昭和54年度秋季大会研究発表要旨*. 160–161.
29. Kano, Y. and T. Asahira. 1979. Effect of endogenous cytokinins in strawberry fruits on their maturing. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 47: 463–472.
30. ———, and ———. 1981. Roles of cytokinin and abscisic acid in the maturing of strawberry fruits. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 50: 31–36.
31. Koshimizu, K., Hayashi, H. and T. Asahira. 1976. Substances with cytokinin activity in tomato fruits. In “Collected abstracts of the papers of the 9th International Conference on Plant Growth Substances.” ed. by Paul-Emile Pilet. 200–202.
32. 黒江伸一. 1971. イチゴ果実の発育および成熟に及ぼす生長調節物質の影響. 京都大学卒業論文.

33. Letham, D. S. 1964. Isolation of a kinin from plum fruitlets and other tissues. In "Régulateurs Naturels de la Croissance Végétale" 109–117.
34. Letham, D. S. and M. W. Williams. 1969. Regulators of cell division in plant tissues. VIII. The cytokinins of the apple fruit. *Physiol. Plant.* 22: 925–936.
35. Lord, W. J. and D. G. White. 1962. The induction of parthenocarpy and an attempt to promote apomixis in the strawberry by treatments with growth regulators. *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.* 80: 350–362.
36. Maxie, E. C. and J. C. Crane. 1968. Effect of ethylene on growth and maturation of the fig, *Ficus carica* L., fruit. *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.* 92: 255–267.
37. Miller, C. O. 1963. Kinetin and kinetin-like compounds. In "Modern methods of plant analysis. Vol. 6." ed. by H. F. Linskens and M. V. Tracey. 194–202.
38. _____. 1965. Evidence for the natural occurrence of zeatin and derivatives: Compounds from maize which promote cell division. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 54: 1052–1058.
39. _____. 1967. Cytokinins in *Zea mays*. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 144: 251–257.
40. Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473–497.
41. Nitsch, J. P. 1950. Growth and morphogenesis of the strawberry as related to auxin. *Amer. J. Bot.* 37: 211–215.
42. _____. 1951. Growth and development *in vitro* of excised ovaries. *Amer. J. Bot.* 38: 566–577.
43. _____. 1952. Plant hormones in the development of fruits. *Quart. Rev. Biol.* 27: 33–57.
44. _____. 1955. Free auxins and free tryptophane in the strawberry. *Plant Physiol.* 30: 33–39.
45. Nitsch, J. P., Asahira, T., Luisa M. E. Rossini et C. Nitsch. 1970. Bases physiologiques de la production de chair de pomme et de poire *in vitro*. *Bull. Soc. bot. Fr.* 117: 479–492.
46. Oritani, T. and R. Yoshida. 1976. Studies on nitrogen metabolism in crop plants. XIV. Changes in cytokinins in rice grains during ripening. *Proc. Crop Sci. Soc. Japan.* 45: 429–435.
47. Powell, L. E. and C. Pratt. 1964. Kinins in the embryo and endosperm of *Prunus persica*. *Nature.* 204: 602–603.
48. Prakash, R. and S. C. Maheshwari. 1970. Studies on cytokinins in watermelon seeds. *Physiol. Plant.* 23: 792–799.
49. Pratt, H. K. and J. D. Goeschl. 1968. The role of ethylene in fruit ripening. In "Biochemistry and physiology of plant substances" F. Wightman and G. Setterfield, eds. 1295–1302. Runge Press. Ottawa.

50. Ringe, F. and J. P. Nitsch. 1968. Conditions leading to flower formation on excised *Begonia* fragments cultured *in vitro*. *Plant and Cell Physiol.* 9: 639–652.
51. Rudnicki, R., J. Pieniazek and N. Pieniazek. 1968. Abscisin II in strawberry plants at two different stages of growth. *Bul. Acad. pol. Sci., Ser. Sci. Biol.*, 16: 127–130.
52. Rudnicki, R. and J. Pieniazek. 1970. The changes in concentration of abscisic acid (ABA) in developing and ripe apple fruits. *Bull. Acad. pol. Sci., Ser. Sci. Biol.*, 18: 577–580.
53. ———. and ———. 1971. Free and bound abscisic acid in developing and ripe strawberries. *Bull. Acad. pol. Sci., Ser. Sci. Biol.* 19: 421–423.
54. Sandstedt, R. 1971. Cytokinin activity during development of cotton fruit. *Physiol. Plant.* 24: 408–410.
55. Skoog, F. and C. O. Miller. 1957. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. *Symp. Soc. Exp. Biol.* 11: 118–131.
56. Steward, F. C., M. O. Mapes and K. Mears. 1958. Growth and organized development of cultured cells. II. Organization in cultures grown from freely suspended cells. *Amer. J. Bot.* 45: 705–708.
57. 田辺賢二, 佐藤一郎, 田中重勝. 1972. イチゴ果実の發育生理に関する研究. 果実の發育に伴う呼吸量ならびに有機成分の変化. 園芸学会昭和47年度秋季大会研究発表要旨. 190–191.
58. Thompson, P. A. 1961. Evidence for a factor which prevents the development of parthenocarpic fruits in the strawberry. *J. Exp. Bot.* 12: 199–206.
59. ———. 1963. The development of embryo, endosperm and nucellus tissues in relation to receptacle growth in the strawberry. *Ann. Bot.* 27: 589–605.
60. ———. 1964. The effect of applied growth substances on development of strawberry fruit. I. Induction of parthenocarpy. *J. Exp. Bot.* 15: 347–358.
61. ———. 1967. Promotion of strawberry fruit development by treatment with growth regulating substances. *Hort. Res.* 7: 13–23.
62. ———. 1969. The effect of applied growth substances on development of the strawberry fruit. II. Interactions of auxins and gibberellins. *J. Exp. Bot.* 20: 629–647.
63. Tukey, H. B. 1936. Development of cherry and peach fruits as affected by destruction of the embryo. *Bot. Gaz.* 98: 1–24.
64. Young, R. E., H. K. Pratt and J. B. Biale. 1952. Manometric determination of low concentrations of ethylene. *Analytical Chemistry.* 24: 551–555.

Studies on the development of strawberry fruit.

1982

Yasutaka Kano

Summary

This research was carried out to determine the role of achenes (seeds) in the development of strawberry fruits in relation to plant hormones.

Chapter 1 – Section 1. The role of achenes in the *in vitro* culture of tissues of strawberry fruits.

In order to investigate the role of achenes in fruit development, effects of the physiological age of fruit tissues and achenes on callus and shoot formation from cultured fruit tissues were studied. Fruits from plants raised in a vinyl house were sampled for tissue culture. When fruit tissues, 4 x 4 x 4 mm large, from fruits 2 and 7 days after anthesis were cut off, without removal of achenes, and they were cultured on the medium supplemented with 0 or 0.1 mg/l of N⁶-benzyladenine (BA) + 1 or 5 mg/l of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, (2,4-D) white friable callus was produced around the basal part of the explant. When fruit tissues from fruits 2 and 7 days after anthesis were cut off, with removal of achenes and they were cultured on the medium with 1 or 5 mg/l of BA + 0.1 or 1 mg/l of 2,4-D, green firm callus was produced and then shoots were formed from this callus. Thus, when fruit tissues the same number of days after anthesis were cultured on the medium with the same ratio of auxin/cytokinin, white friable callus was formed in culturing on the medium with the same ratio of auxin/cytokinin, white friable callus was formed in culturing fruit tissues without achenes, while green firm callus, which is capable shooting, was formed in culturing fruit tissues with achenes. When fruit tissues 12 days after anthesis were cultured on the medium with 0.1 or 5 mg/l of BA + 1 or 5 mg/of 2,4-D, regardless of the presence or absence of achenes, pale green firm callus composed of very small cells was formed, but no shoots were formed. Thus, pale green callus, which is incapable shooting was formed as the physiological age of fruit tissues went on. When fruit tissues 17 days after anthesis were cultured, only cell enlargement was observed regardless of the presence or absence of achenes, but no callus was formed without regard to the concentrations of the plant hormones supplemented to the medium.

In comparing the results mentioned above with the results of Skoog and Miller (1957), namely when tobacco pith tissues were cultured, friable callus composed of large cells was formed on the medium with high ratio of auxin/cytokinin, firm callus composed of small cells was formed on the low ratio of auxin/cytokinin, and shoot formations were observed on the middle ratio of auxin/cytokinin, it is suggested that the level of endogenous cytokinin in strawberry fruits was the highest in the middle stage of fruit development and the level was high in achenes.

Chapter 1—Section 2. The role of carpels in the development of strawberry fruits cultured *in vitro* and the effect of plant hormones on the development of the fruits.

Fruits, one day prior to anthesis, were cultured *in vitro* to determine the role of carpels (developed into achenes after fertilization) and the effect of plant hormones. Fruits, one day prior to anthesis, from plants raised in a vinyl house were sampled for organ culture.

Fruits from which carpels were removed enlarged normally as fruits with carpels on the medium with α -naphthaleneacetamide (NAAm), a kind of synthetic auxin. The maturing of fruits with carpels cultured on the medium supplemented with NAAm was suppressed in comparison to that of fruits without carpels on the same medium. This suggests that an inhibitory substance(s) for fruit growth and maturing is produced in developing carpels.

When fruits with or without carpels were cultured on the medium with gibberellic acid (GA_3), in either fruit, only the basal portion, which was originally devoid of carpels, swelled, but the upper portion, where there were carpels originally, showed no growth. With addition of GA_3 to the medium with NAAm, fruits with carpels enlarged into normal shape and their growth and maturing were promoted in comparison to those of fruits on the medium with NAAm. Thus, gibberellin can be considered to promote the growth and maturing of fruits when it coexists with auxin.

When fruits with or without carpels were cultured on the medium with BA, a kind of synthetic cytokinin, and NAAm, the growth and maturing were suppressed in either fruit as the concentration of BA increased.

When fruits with or without carpels were cultured on the medium with N^6 -benzyladenine (BA), a kind of synthetic cytokinin, and NAAm, the growth and maturing were suppressed in either fruit as the concentration of BA increased.

To destroy chemically the tissues inside carpels, instead of removal of carpels, fruits with carpels were cultured on the medium with maleic hydrazide (MH), an inhibitor of cell division, and NAAm. The browning of the carpels became severe as the concentration of MH increased, and the growth and maturing were promoted.

Based on these results, it is suggested that auxin is more essential for the growth of strawberry fruits than gibberellin, and the carpel is the production site of cytokinin, which suppresses the growth and maturing of strawberry fruits.

Putting together **SECTION 1** and **SECTION 2**, it is suggested that the level of cytokinin which suppresses the growth and maturing of strawberry fruits is the highest in the middle stage of fruit development, and the level is high in achenes.

Chapter 2. The role of endogenous cytokinins in the development of strawberry fruits. This research was carried out for the purpose of precise discussion of the role of endogenous cytokinins in fruit development. For the extraction of cytokinins, fruits were sampled from plants raised in a glass-

house maintained at 20°C or 30°C. For organ culture, fruits were sampled from plants raised in a vinyl house.

First, the existence of cytokinin-like substances in fruits was investigated. An acidified methanol extract of fruits was extracted with ethyl acetate. The remaining aqueous layer was percolated through a column of cation exchange resin. The absorbed substances were eluted with ammonia water and the level of cytokinin in the ammonia eluate fraction was bioassayed by Miller's soybean callus test. High cytokinin level was detected in this fraction. In a paper chromatography of the ammonia eluate fraction of the aqueous layer, it is clarified that a nucleotide of zeatin, zeatin and zeatin riboside were contained in this fraction. On the other hand, the ethyl acetate soluble layer of an acidified methanol extract was column-chromatographed and the ethyl acetate fraction was bioassayed by Miller's soybean callus test. Considerable high level was detected. This might be due to a new type of cell division promoting factors.

Second, the distribution of cytokinin level in fruits was studied. About 70% of the total level in whole fruits was contained in achenes and about 30% in receptacles. Thus, the majority of total level in strawberry fruits was contained in achenes. Therefore, it is considered that achenes are the production site of cytokinin in fruits.

Third, changes of cytokinin level in fruits during fruit and achene development with fruit development were investigated. Cytokinin level in fruits was the highest 10–15 days after anthesis and decreased gradually as fruit developed. The achene of fruits 10–15 days after anthesis was still immature as the ovule cavity was mostly occupied by the endosperm. On the other hand, the achene of fruits 25 days after anthesis, 3 days prior to maturity, was mature as the ovule cavity was filled with the embryo. Therefore, it is reasonable to consider that cytokinin level in young fruits is high owing to the active production of cytokinins in immature achenes and the level in fruits declines gradually with the maturing of achenes.

Fourth, the effect of temperature on fruit development and cytokinin level in fruits was studied. The time of maturing of fruits grown at 20°C was delayed compared to that of fruits at 30°C. Fifteen days after anthesis, cytokinin level in fruits at 20°C was much higher than that in fruits at 30°C, and the achene of fruits at 20°C was still immature compared to that of fruits at 30°C. Therefore, it might be possible to consider that the time of maturing of fruits at 20°C is delayed because high cytokinin level can be maintained in achenes until late due to their slow development.

Lastly, the effect of MH on the development of fruits cultured *in vitro* and cytokinin level in fruits was studied. Fruits one day prior to anthesis were cultured without removal of achenes. The growth and maturing of fruits on the medium with NAAM and MH was promoted compared to those of fruits on the medium with NAAM. After a 24-day culture period, the level of cytokinin in fruits on the medium with MH was much lower than that in fruits on the medium without MH. The carpels

of fruit cultured on the medium without MH remained green but those on the medium with MH turned dark brown. Thus, it is considered that cytokinin level in fruits on the medium with MH is low because the development of carpels is inhibited by MH.

From these results, the maturing of strawberry fruits is considered as follows. Fruit development under the condition which delays achene development become slow because high cytokinin level can be maintained in achenes until late due to their slow development. On the other hand, fruit development under the condition which destroys the tissues of achenes or fulfilled earlier achene development is accelerated due to the rapid decrease of cytokinin level in fruits.

Chapter 3. The role of ABA in the development of strawberry fruits. The role of abscisic acid (ABA) in fruit development and the interaction of ABA and cytokinin in fruit development were investigated. For the extraction of ABA, fruits from plants raised in a glasshouse maintained at 20°C or 30°C were used. For organ culture, fruits, one day prior to anthesis, sampled from plants raised in a vinyl house were used.

Fruits grown at 30°C matured earlier than those at 20°C. The level of the substance(s) which acts inhibitory in a bioassay using rice seedlings increased with their maturing. This inhibitor level in fruits grown at 30°C was already detected 15 days after anthesis, and thereafter it increased remarkably until 20 days after anthesis. On the other hand, the inhibitor level in fruits grown at 20°C was not observed 15 and 20 days after anthesis, but it was detected 25 days after anthesis, and it increased until maturity, 28 days after anthesis. Thus, the inhibitor level appeared and reached high level earlier in fruits grown at 30°C than in those grown at 20°C. In chromatographing of the inhibitor(s) on a Sephadex column, a peak of inhibitory level in a bioassay using rice seedlings was found in fractions 5 and 6, corresponding with those of authentic ABA. Based on these results, it is considered that ABA level in fruits increased with their development and the level increased earlier in fruits which matured earlier.

Then, the effect of ABA on fruit maturing was studied. In one experiment, fruits one day prior to anthesis were cut off without removal of carpels and they were cultured *in vitro* on the medium with ABA. In another experiment, fruits prior to maturity were sampled from plants raised in a glasshouse maintained at 20°C and they were kept on filter papers wetted with ABA solution in Petri dishes. In either case, fruit maturing was promoted by ABA treatment, and furthermore, the promotion of the maturing of fruits was intensified as ABA concentration increased. Therefore, it is considered that fruit maturing is accelerated due to the increase of the level of ABA.

As previously stated, it was clarified that fruit maturing is induced due to the decline of the level of cytokinin. By putting together the results of the previous experiments with cytokinin and those of the present experiments with ABA, it is acceptable that in latter half of the fruit development,

ABA level is high in the fruits with low cytokinin level. This makes us consider two assumptions for fruit maturing; (1) the maturing is accelerated by rising of ABA level and/or lowering of cytokinin level, synergistically or independently, (2) lowering of cytokinin level induces rising of ABA level and only the latter promotes the maturing.

To find out which assumption the right lies, fruits one day prior to anthesis were sampled from plants without removal of carpels and they were cultured *in vitro* on the medium with BA and ABA, fruit maturing was controlled by ABA regardless of the presence of BA. This indicates that cytokinin itself does not directly affect fruit maturing and rejects assumption (1).● On the other hand, fruits one day prior to anthesis were sampled from plants without removal of carpels and they were cultured *in vitro* on the medium with and without BA. The maturing of fruits on the medium with BA was suppressed compared to that of fruits on the medium without BA. After a 27-day culture period, ABA level in fruits on the medium with BA was lower than that in fruits on the medium without BA. On the contrary, fruits one day prior to anthesis were sampled from plants with or without removal of carpels. The maturing of fruits without carpels on the medium with NAAm was promoted compared to that of fruits with carpels on the same medium. After a 17-day culture period, ABA level in fruits without carpels was higher than that in fruits with carpels. Furthermore, fruits one days prior to anthesis were sampled from plants without removal of carpels. The maturing of fruits cultured on the medium with MH and NAAm was accelerated compared to that of fruits cultured on the medium with NAAm. After a 24-day culture period, ABA level in fruits on the medium with MH was higher than that of fruits on the medium without MH. Thus, ABA level in fruits was low in the fruits with high cytokinin level, while the level was high in the fruits with low cytokinin. This result supports the assumption (2).

In conclusion, the suppressing ability of cytokinin on ABA synthesis declines in the later stage of the development of strawberry fruits due to the decrease of cytokinin level. Thereafter, ABA level in fruits increases owing to active ABA synthesis. Such high level of ABA results to promote fruit maturing.

Chapter 4. The role of ethylene in the development of strawberry fruits. To make clear the role of ethylene in fruit maturing, ethylene evolution from fruits was investigated. For the measurement of ethylene evolution from fruits, fruits cut off from plants which was raised in a glasshouse maintained at 20°C or 30°C, and fruits, which were sampled from plants one day prior to anthesis, cultured *in vitro* were used. For ethylene treatment to fruits, fruits prior to maturity were sampled from plants raised in a vinyl house.

First, the effect of temperature on ethylene evolution from fruits was studied. Ethylene evolution from fruits grown at 20°C reached a maximum 25 days after anthesis when fruit color turned

to red. On the other hand, the evolution from fruits grown at 30°C reached a maximum 18 days after anthesis. This was 7 days earlier than the time when ethylene evolution from fruits grown at 20°C reached a maximum. Thus, the peak of ethylene evolution from fruits which matured earlier appeared earlier than that of the evolution from fruits matured later.

Second, the effect of cytokinin on ethylene evolution from fruits was studied. Fruits one day prior to anthesis were sampled from plants without removal of carpels. Fruits cultured *in vitro* on the medium with BA and without BA in the presence of NAAm were sampled for ethylene measurement. The time of maturing of fruits on the medium with BA was delayed compared to that of maturing of fruits on the medium without BA. The pattern of changes of ethylene evolution from fruits cultured *in vitro* was quite different from that of changes of ethylene evolution from fruits developed on plants. Namely, ethylene evolution from fruits cultured *in vitro* decreased with their development, but the evolution increased when fruits began to turned to red. The time, when the evolution from fruits on the medium with BA began to increase, came to 5 days later than that when the evolution from fruits on the medium without BA began to increase. Thus, the evolution from fruits, which matured late, began late to increase.

Third, the effect of ABA on ethylene evolution from fruits were studied. Fruits, whose color was whitish green, were held on filter papers wetted with the solution of ABA and distilled water in Petri dishes. Five days after treatment, the color of fruits treated with ABA turned to pink, while the color of fruits treated with distilled water was still white. Ethylene evolution from fruits treated with ABA was 1.74 times as much as that from fruits treated with distilled water. Thus, ethylene evolution from fruits increased when fruits began to red and the evolution from fruits matured earlier increased earlier. These results suggest that ethylene accelerates fruit maturing.

Lastly, the effect of exogenous ethylene on fruit maturing was investigated. Fruits prior to maturity were stored in a gas-tight glass ware which contained ethylene gas. When fruits, whose color was whitish green, were stored, fruit maturing was rather suppressed. When fruits, whose color was white, were used, ethylene has no effect on fruit maturing. Thus, ethylene evolution from fruits reached a maximum just prior to maturity, while exogenous ethylene has no effect on fruit maturing.

As the reasons why ethylene has no effect on the maturing of strawberry fruits, following two assumptions are proposed. (1) ethylene is a by-product of fruit maturing. (2) when fruit tissues are susceptible to exogenous ethylene, endogenous ethylene already exists in the tissues enough to promote fruit maturing.